



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁴ : C12N 15/00, 1/20, C12P 21/02 A01N 63/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 88/ 09812 (43) Date de publication internationale: 15 décembre 1988 (15.12.88)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR88/00292 (22) Date de dépôt international: 9 juin 1988 (09.06.88) (31) Numéros des demandes prioritaires: 87/08090 88401121.4 (EP) (32) Dates de priorité: 10 juin 1987 (10.06.87) 6 mai 1988 (06.05.88) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR (FR/FR); 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (FR/FR); 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SANCHIS, Vincent (FR/FR); 15, avenue Toulouse-Lautrec, F-78390 Bois-d'Arcy (FR). LERECLUS, Didier (FR/FR); 16 bis, rue Lauriston, F-75116 Paris (FR). MENU, Ghislaine (FR/FR);	22, rue Rosenwald, F-75015 Paris (FR). LECADET, Marguerite-Marie (FR/FR); 10, rue Nicolas-Charlet, F-75015 Paris (FR). MARTOURET, Daniel (FR/FR); 6, square de l'Hôtel-de-Ville, F-78210 Saint-Cyr-l'Ecole (FR). DEDONDER, Raymond (FR/FR); 3, allée des Pépinières, F-92290 Châtenay-Malabry (FR). (74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud, 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: BJ (brevet OAPI), CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CM (brevet OAPI), GA (brevet OAPI), JP, ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), SN (brevet OAPI), TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US. Publiée Avec rapport de recherche internationale.	

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR POLYPEPTIDES EXERCISING A LARVICIDAL EFFECT IN LEPIDOPTERA

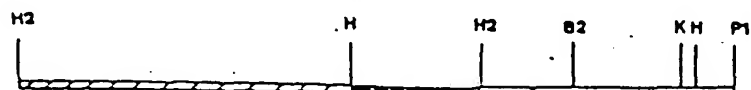
(54) Titre: SEQUENCES DE NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES POLYPEPTIDES DOTES D'UNE ACTIVITE LARVICIDE VIS-A-VIS DE LEPIDOPTERES

(57) Abstract

A nucleotide sequence coding for at least one part of the terminal N region of a polypeptide which exercises a specific toxic effect on Lepidoptera of the Noctuidae family, preferably on *S.littoralis*, is characterized by its capacity for hybridisation with a gene capable of expressing a polypeptide exercising a toxic effect on *S.littoralis* larvae.

(57) Abrégé

L'invention concerne une séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de *S.littoralis*, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de *S.littoralis*.



DNA OF VECTOR

ADN du vecteur pUC9

B2 : Bgl II

DNA OF STRAIN

ADN de la souche *entomocidus* 601

H : Hind III

DNA OF STRAIN

ADN de la souche *sizavai* 7-29

H2 : Hinc II

K : Kpn I

P1 : Pst I

1 Kb

11/04/89

DEMANDE INTERNATIONALE
SELON LE TRAITÉ
DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS

REQUÊTE

LE SOUSSIGNÉ REQUIERT QUE LA PRÉSENTE DEMANDE
INTERNATIONALE SOIT TRAITÉE CONFORMÉMENT
AU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

Cadre réservé à l'office récepteur.
DEMANDE INTERNATIONALE N°:

DATE DU DÉPÔT
INTERNATIONAL:

(Cachet)

Nom de l'office récepteur et «Demande internationale PCT»

Cote du dossier du déposant ou du mandataire
(indiquée par le déposant s'il le désire)

0645 A/P

Cadre N° I TITRE DE L'INVENTION

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR DES POLYPEPTIDES DOTES
D'UNE ACTIVITE LARVICIDE VIS-A-VIS DE LEPIDOPTERES.

Cadre N° II DEPOSANT (QU'IL SOIT OU NON ÉGALEMENT INVENTEUR): ETATS DESIGNÉS POUR LES-
QUELS IL EST DEPOSANT. Utiliser le présent cadre pour indiquer le déposant ou, s'il y en a plusieurs, l'un d'entre eux. S'il y a plus
d'une personne (celle-ci peut éventuellement être une personne morale), continuer dans le cadre N° III.

La personne indiquée dans le présent cadre est (cocher une seule case): ☐ déposant et inventeur* ☒ déposant seulement

Nom et adresse:**

INSTITUT PASTEUR
25-28 rue du Dr. Roux
75724 PARIS CEDEX 15 (France)

Numéro de téléphone:
(préciser l'indicatif)

Adresse télégraphique:

Adresse de télécopieur:

Pays de la nationalité:

Pays du domicile:***

FRANCE

FRANCE

La personne indiquée dans le présent cadre est *déposant* (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés

☒ tous les Etats désignés sauf
les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis
d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans
le "Cadre supplémentaire"

Cadre N° III AUTRES DÉPOSANTS, LE CAS ÉCHÉANT; (AUTRES) INVENTEURS, LE CAS ÉCHÉANT; ETATS
DESIGNÉS POUR LESQUELS ILS SONT DEPOSANTS (LE CAS ÉCHÉANT). Il convient de remplir un sous-cadre pour
chaque personne (celle-ci peut éventuellement être une personne morale). Si les deux sous-cadres ci-après ne suffisent pas, continuer dans
le "Cadre annexe", (en donnant pour chaque personne supplémentaire les mêmes indications que dans les deux sous-cadres ci-après) ou
utiliser une "feuille annexe".

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☐ déposant et
inventeur* ☒ déposant
seulement ☐ inventeur
seulement*

Nom et adresse:**

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
147 rue de l'Université
75341 PARIS CEDEX 07 (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est *déposant* (ou à la fois *déposant et inventeur*) préciser également:

Pays de la nationalité:

FRANCE

Pays du domicile:***

FRANCE

et si elle est *déposant* (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés

☒ tous les Etats désignés sauf
les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis
d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans
le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☒ déposant et
inventeur* ☐ déposant
seulement ☐ inventeur
seulement*

Nom et adresse:**

SANCHIS Vincent
15 avenue Toulouse Lautrec
78390 BOIS D'ARCY (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est *déposant* (ou à la fois *déposant et inventeur*) préciser également:

Pays de la nationalité:

FRANCE

Pays du domicile:***

FRANCE

et si elle est *déposant* (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés

☐ tous les Etats désignés sauf
les Etats-Unis d'Amérique

☒ les Etats-Unis
d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans
le "Cadre supplémentaire"

* Si la personne indiquée comme "déposant et inventeur" ou comme "inventeur seulement" n'est pas un *inventeur* pour tous les Etats
désignés, donner les indications nécessaires dans le "Cadre annexe".

** Indiquer le nom d'une personne physique en donnant son nom de famille, immédiatement suivi du (des) prénoms. Indiquer le nom
d'une personne morale en donnant sa désignation officielle complète. Inclure dans l'adresse à la fois le code postal (le cas échéant) et
le pays (nom).

*** Faute d'indication du domicile, il sera supposé que le pays du domicile est le même que le pays indiqué dans l'adresse.

58/11/1989
Adel 12/11/89

Cadre N° III SUITE (S'IL Y A DES INVENTEURS EN PLUS QUE DES DÉPOSANTS). AUTRES DÉPOSANTS, LE CAS ÉCHÉANT; ETAT: (AUTRES) INVENTEURS, LE CAS ÉCHÉANT. (LE CAS ÉCHÉANT). Il convient de remplir un sous-cadre pour chaque personne (celle-ci peut éventuellement être une personne morale).

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☒ déposant et inventeur* ☐ déposant seulement ☐ inventeur seulement*

Nom et adresse:**

LERECLUS Didier
16 bis rue Lauriston
75116 PARIS (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: FRANCE

Pays du domicile:*** FRANCE

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☒ déposant et inventeur* ☐ déposant seulement ☐ inventeur seulement*

Nom et adresse:**

MENOU Ghislaine
22 rue Rosenwald
75015 PARIS (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: FRANCE

Pays du domicile:*** FRANCE

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☒ déposant et inventeur* ☐ déposant seulement ☐ inventeur seulement*

Nom et adresse:**

LECADET Marguerite-Marie
10 rue Nicolas Charlet
75015 PARIS (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: FRANCE

Pays du domicile:*** FRANCE

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☒ déposant et inventeur* ☐ déposant seulement ☐ inventeur seulement*

Nom et adresse:**

MARTOURET Daniel
6 Square de l'Hôtel de Ville
78210 SAINT-CYR-L'ECOLE (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: FRANCE

Pays du domicile:*** FRANCE

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

* Si la personne indiquée comme "déposant et inventeur" ou comme "inventeur seulement" n'est pas un inventeur pour tous les Etats désignés, donner les indications nécessaires dans le "Cadre annexe".

** Indiquer le nom d'une personne physique en donnant son nom de famille, immédiatement suivi du (des) prénoms. Indiquer le nom d'une personne morale en donnant sa désignation officielle complète. Inclure dans l'adresse à la fois le code postal (le cas échéant) et le pays (nom).

*** Faute d'indication du domicile, il sera supposé que le pays du domicile est le même que le pays indiqué dans l'adresse.

Si cette feuille annexe n'est pas utilisée, il n'est pas nécessaire de l'inclure dans la requête.

Cadre N° III SUITE (S'adresser à l'ESSAIRE) AUTRES DÉPOSANTS, LE CAS ÉCHÉANT; ETAT UNIS POUR LESQUELS ILS SONT DÉPOSANTS, LE CAS ÉCHÉANT; (AUTRES) INVENTEURS, LE CAS ÉCHÉANT. Il convient de remplir un sous-cadre pour chaque personne (celle-ci peut éventuellement être une personne morale).

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☒ déposant et inventeur* ☐ déposant seulement ☐ inventeur seulement*

Nom et adresse **

DEDONDER Raymond
3 allée des Pépinières
92290 CHATENAY-MALABRY (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: FRANCE

Pays du domicile:*** FRANCE

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☐ déposant et inventeur* ☐ déposant seulement ☐ inventeur seulement*

Nom et adresse:**

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

Pays du domicile:***

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☐ déposant et inventeur* ☐ déposant seulement ☐ inventeur seulement*

Nom et adresse:**

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

Pays du domicile:***

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case): ☐ déposant et inventeur* ☐ déposant seulement ☐ inventeur seulement*

Nom et adresse:**

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

Pays du domicile:***

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

* Si la personne indiquée comme "déposant et inventeur" ou comme "inventeur seulement" n'est pas un inventeur pour tous les Etats désignés, donner les indications nécessaires dans le "Cadre annexe".

** Indiquer le nom d'une personne physique en donnant son nom de famille, immédiatement suivi du (des) prénoms. Indiquer le nom d'une personne morale en donnant sa désignation officielle complète. Inclure dans l'adresse à la fois le code postal (le cas échéant) et le pays (nom).

*** Faute d'indication du domicile, il sera supposé que le pays du domicile est le même que le pays indiqué dans l'adresse.

Si cette feuille annexe n'est pas utilisée, il n'est pas nécessaire de l'inclure dans la requête.

Cadre No IV MANDATAIRE (LE CAS ECHEANT) OU REPRESENTANT COMMUN (LE CAS ECHEANT); ADRESSE POUR LES NOTIFICATIONS (DANS CERTAINS CAS). Un représentant commun ne peut être nommé que s'il y a plusieurs déposants et si aucun mandataire n'est ou n'a été nommé, le représentant commun doit être l'un des déposants. La personne suivante (celle-ci peut éventuellement être une personne morale) est/ a été nommée comme mandataire ou comme représentant commun pour agir au nom du/ des déposant(s) auprès des autorités internationales compétentes:

Nom et adresse, comprenant le code postal et le pays:

Si l'espace ci-dessous est utilisé pour indiquer une adresse pour des notifications, cocher ici ☐

S.C. ERNEST GUTMANN YVES PLASSERAUD
67 boulevard Haussmann
75008 PARIS (FRANCE)

Numéro de téléphone: 47.42.82.82 (préciser l'indicatif)

Adresse télégraphique: 280210F

Adresse de télécopieur:

Cadre No V DESIGNATION DE GROUPES D'ETATS OU D'ETATS¹⁾; CHOIX DE CERTAINES FORMES DE PROTECTION OU DE TRAITEMENT. Les désignations suivantes sont faites (cocher les cases appropriées):

Brevet régional

☐ EP Brevet européen²⁾: AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, DE Allemagne (République fédérale d'), FR France, GB Royaume-Uni, IT Italie, LU Luxembourg, NL Pays-Bas, SE Suède, et tout autre Etat contractant de la Convention sur le brevet européen qui est devenu partie au PCT après la publication de la présente feuille (préciser sur la ligne pointillée):

☒ OA Brevet OAPI: Bénin, Cameroun, Congo, Gabon, Mali, Mauritanie, République centrafricaine, Sénégal, Tchad, Togo et tout autre Etat membre de l'OAPI qui est devenu partie au PCT après la publication de la présente feuille; si un autre titre de l'OAPI est désiré, le préciser sur la ligne pointillée³⁾:

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est désirée, la préciser sur la ligne pointillée³⁾)

☐ AT Autriche³⁾
☐ AU Australie³⁾
☐ BB Barbade
☐ BG Bulgarie³⁾
☐ BR Brésil³⁾
☐ CH et LI Suisse et Liechtenstein
☐ DE Allemagne (République fédérale d')³⁾
☐ DK Danemark
☐ FI Finlande
☐ GB Royaume-Uni
☐ HU Hongrie
☒ JP Japon³⁾
☐ KP République populaire démocratique de Corée³⁾

☐ KR République de Corée³⁾
☐ LK Sri Lanka
☐ LU Luxembourg³⁾
☐ MC Monaco³⁾
☐ MG Madagascar
☐ MW Malawi³⁾
☐ NL Pays-Bas
☐ NO Norvège
☐ RO Roumanie
☐ SD Soudan
☐ SE Suède
☐ SU Union soviétique³⁾
☒ US Etats-Unis d'Amérique³⁾

Espace réservé pour désigner des Etats (aux fins d'un brevet national) qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille:

- 1) L'ordre des désignations choisi par le déposant peut être indiqué en marquant dans les cases des numéros d'ordre en chiffres arabes (voir également les notes relatives au cadre No V).
- 2) La sélection d'Etats particuliers pour un brevet européen peut être faite lors de l'ouverture de la phase nationale (régionale) devant l'Office européen des brevets (voir également les notes relatives au cadre No V).
- 3) Si une autre forme de protection ou un titre additionnel ou, aux Etats-Unis d'Amérique, un traitement à titre de "continuation" ou de "continuation-in-part" est désiré, le préciser conformément aux instructions données dans les notes relatives au cadre No V.

Cadre N° VI REVENDICATION DE PRIORITÉ (LE CAS ÉCHÉANT) La présente demande est revendiquée			
Pays (s'il s'agit d'une demande nationale, pays où elle a été déposée; s'il s'agit d'une demande régionale ou internationale, l'un des pays pour lesquels elle a été déposée)	Date de dépôt (jour, mois, année)	Demande N°	Office de dépôt (ne remplir que si la demande antérieure est une demande internationale ou une demande régionale)
1) FRANCE	10/06/1987	87 08090	
2) BREVET EUROPEËN (FRANCE)	06/05/1988	88.401121.4	FRANCE
3)			

(On peut utiliser un code littéral pour indiquer le pays et/ou l'office de dépôt)

Lorsque la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur, le déposant peut, contre paiement de la taxe requise, demander ce qui suit:

☐ L'office récepteur est prié de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la demande antérieure/des demandes antérieures identifiées ci-dessus par des numéros (indiquer les numéros)

Cadre N° VII RECHERCHE ANTÉRIEURE (LE CAS ÉCHÉANT). Remplir si une recherche (internationale, de type international ou autre) a déjà été demandée (ou effectuée) à l'administration chargée de la recherche internationale et si ladite administration est maintenant priée de fonder la recherche internationale, dans la mesure du possible, sur les résultats de ladite recherche antérieure. Prière de l'identifier en se référant à la demande pertinente (ou à sa traduction) ou à la demande de recherche.

Numéro de la demande internationale ou pays et numéro (ou office régional) d'une autre demande.

Date de dépôt international/régional/national:

10 juin 1987

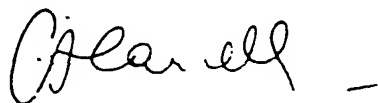
87.08090
Date de la demande de recherche.

Numéro attribué à la demande de recherche (s'il est connu):

10 juin 1987

FA 398768

Cadre N° VIII SIGNATURE DU/DES DÉPOSANT(S) OU DU MANDATAIRE



PEAUCELLE Chantal

Si le présent formulaire de requête est signé par un mandataire au nom d'un déposant, un pouvoir séparé, nommant le mandataire et signé par le déposant, est requis. Si l'on désire, dans ce cas, utiliser un pouvoir général (déposé auprès de l'office récepteur), une copie de ce dernier doit accompagner ce formulaire.

Cadre N° IX BORDEREAU (à remplir par le déposant)				La présente demande internationale est accompagnée, telle que déposée, des pièces identifiées ci-dessous:		
La présente demande internationale comprend le nombre de feuilles suivant:				1.	<input type="checkbox"/> pouvoir séparé signé	
1	requête	6	feuilles	2.	<input type="checkbox"/> copie du pouvoir général	
2	description	43	feuilles	3.	<input type="checkbox"/> document(s) de priorité (voir le cadre N° VI)	
3	revendications	16	feuilles	4.	<input type="checkbox"/> reçu ou timbres fiscaux pour les taxes payées	
4	abrége	1	feuilles	5.	<input type="checkbox"/> cheque de paiement des taxes	
5	dessins	5	feuilles	6.	<input type="checkbox"/> demande de débit de compte courant	
Total			71	feuilles	7.	<input checked="" type="checkbox"/> autre document (spécifier) Rapport de Recherche

La figure numero des dessins (le cas échéant) est proposée pour accompagner l'abrége lors de la publication.

(Ce qui suit est à remplir par l'office récepteur)

1. Date effective de réception de la prétendue demande internationale:
2. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant la prétendue demande internationale:
3. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11 du PCT:
4. Dessins ☐ reçus ☐ pas de dessins

(Ce qui suit est à remplir par le Bureau international)

Date de réception de l'exemplaire original:

Cadre annexe. Utiliser le cadre dans les cas suivants

- i) si plus de trois personnes sont en cause comme déposants et/ou inventeurs; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° III" et fournir pour chaque personne supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre N° III.
- iii) si, dans le cadre N° II ou dans les sous-cadres du cadre N° III, la case "les Etats désignés indiqués dans le 'cadre annexe' est cochée, dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° II" ou "Suite du cadre N° III" ou "Suite des cadres N° II et III" (selon le cas), indiquer le nom du/des déposant(s) en cause et, à côté de chaque nom, le/les pays (ou EP ou OA, le cas échéant) pour lesquels la personne mentionnée est déposant;
- iiii) Si, dans le cadre N° II ou l'un des sous-cadres du cadre N° III, une personne indiquée comme "déposant et inventeur" ou "inventeur seul" n'est pas inventeur pour tous les Etats désignés ou pour les Etats-Unis d'Amérique; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° II" ou "Suite du cadre N° III" ou "Suite des cadres N° II et III" (selon le cas), indiquer le nom de l'inventeur et, à côté de ce nom, le/les pays (ou EP ou OA, le cas échéant) pour lesquels la personne mentionnée est inventeur;
- iv) s'il y a plusieurs mandataires ayant des adresses différentes; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° IV" et fournir pour chaque mandataire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre N° IV;
- v) si, dans le cadre N° V, le nom d'un pays (ou de l'OAPI) est accompagné de la mention "brevet d'addition", "certificat d'addition" ou "certificat d'auteur d'invention additionnel" ou si, dans le cadre N° V, le nom des Etats-Unis d'Amérique est accompagné de la mention "Continuation" ou "Continuation-in-part"; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° V" et inscrire le nom de chaque pays en cause (ou de l'OAPI) en précisant après le nom de chacun le numéro du titre principal ou de la demande principale ainsi que la date de délivrance du titre principal ou de dépôt de la demande principale;
- vi) si la priorité de plus de trois demandes antérieures est revendiquée; dans ce cas, indiquer "Suite du cadre N° VI" et fournir pour chaque demande antérieure supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre N° VI;
- vii) si l'un des cadres ne suffit pas à contenir tous les renseignements; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° ..." [indiquer le numéro du cadre] et fournir les renseignements conformément aux instructions données dans le cadre dans lequel la place était insuffisante.
- viii) si le déposant a l'intention de revendiquer, à l'égard de tout office désigné, le bénéfice de dispositions de la législation nationale concernant des divulgations non opposables ou des exceptions au défaut de nouveauté; dans ce cas, écrire "Déclaration concernant des divulgations non opposables ou des exceptions au défaut de nouveauté" et fournir ci-dessous cette déclaration.

Suite cadre n° IV "AUTRES MANDATAIRES" :

GUTMANN Ernest
PLASSERAUD Yves
GROSSET-FOURNIER Chantal

Europäisches
Patentamt

Generaldirektion 2

Europe Patent
Office

Directorate General 2

Office européen
des brevets

Direction generale 2

Erhardtstraße 27
D-8000 München 2

☎ 089. 23 99-0
☎ Telex 523 656 epmu d

CHAPITRE II

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

REÇU 28 JUIN 1988

0645AA

AD

Lettre recommandée

S.C. Ernest Gutmann
Yves Plasseraud
67, Boulevard Haussmann

F-75008 PARIS
FRANCE

Inscrire les NOM et ADRESSE du MANDATAIRE
ou, à défaut, du DEPOSANT

EXPEDITEUR: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE L'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU RAPPORT
D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL
émise conformément à la règle 71.1. du PCT

DATE D'EXPEDITION par l'administration
chargée de l'examen préliminaire international

COTE DU DOSSIER DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE

0645.3

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE

Demande internationale No

Date du dépôt international

PCT/FR 88/00292

09.06.1988

Déposant (Nom)

Institut Pasteur et al.

NOTIFICATION

Par la présente il est notifié au déposant que la présente administration chargée de l'examen préliminaire international transmet ci-joint le rapport d'examen préliminaire international, et ses annexes, le cas échéant, établi(s) pour la demande internationale identifiée ci-dessus.

L'attention du déposant est attirée sur le rappel contenu dans le formulaire PCT/IB/332, qu'il a reçu du Bureau international, concernant les délais dans lesquels il doit accomplir certains actes devant chaque office élu.

Une copie du rapport, accompagnée des annexes s'y rapportant, a été expédiée, ce jour même, au Bureau international.

L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

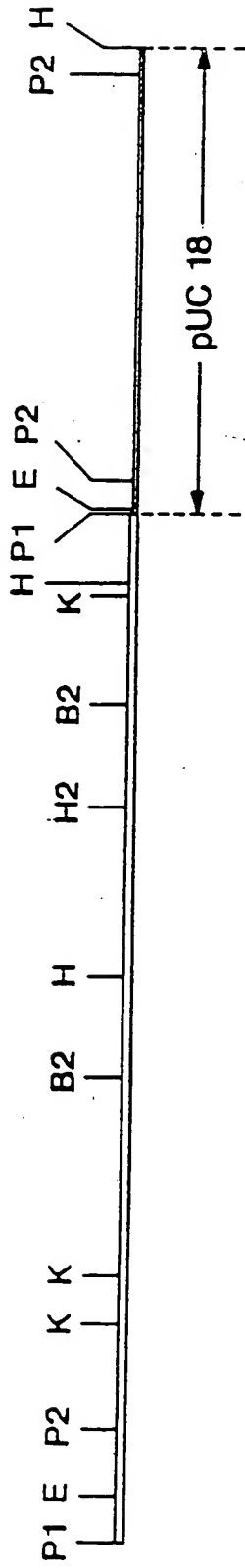
Nom et adresse postale

Fonctionnaire autorisé

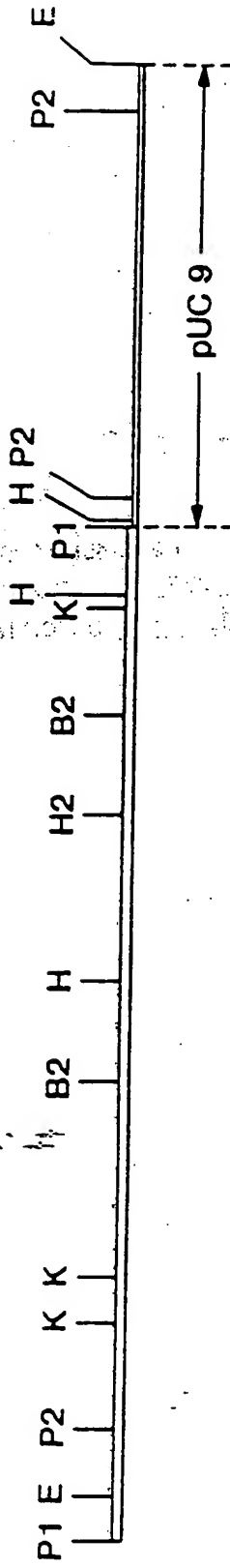
Office européen des brevets

17-5-88

pHTA 6



pHTE 6



B2 : Bgl II K : Kpn I
 E : Eco RI P1 : Pst I
 H2 : Hinc II P2 : Pvu II
 H : Hind III

1 Kb

FIG. 1

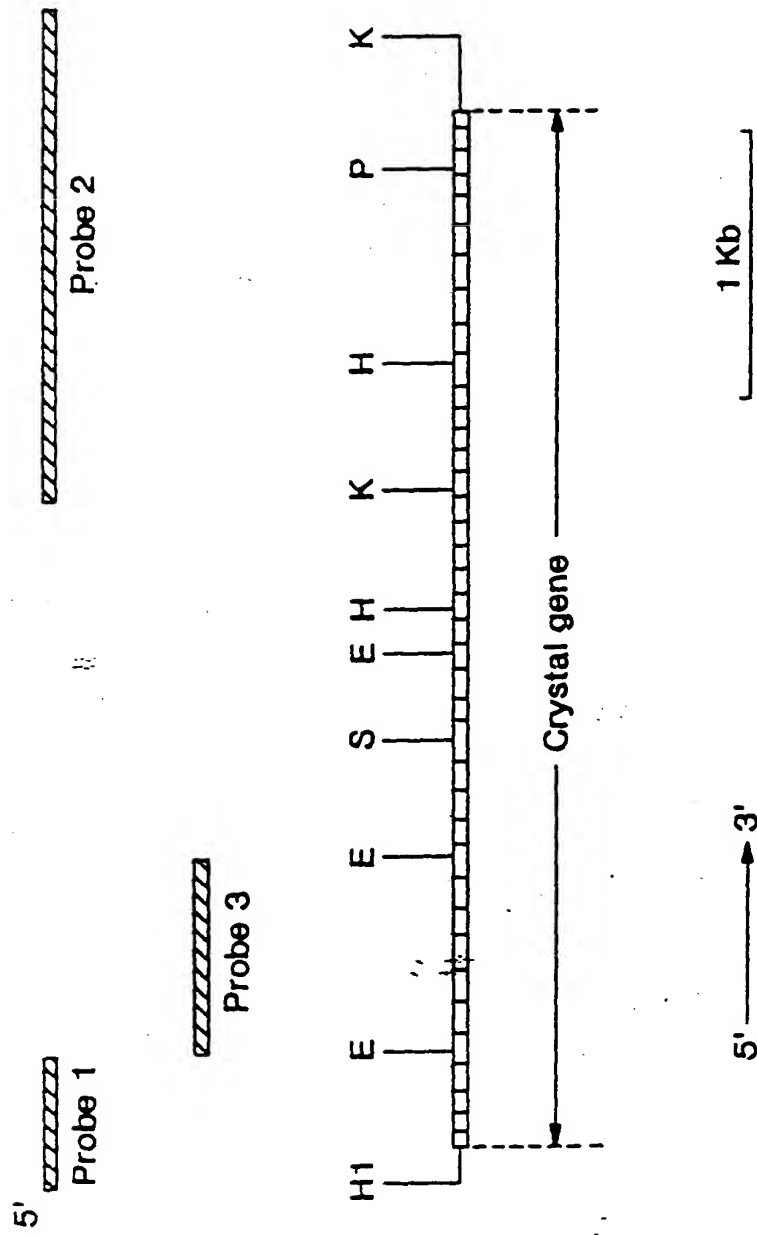
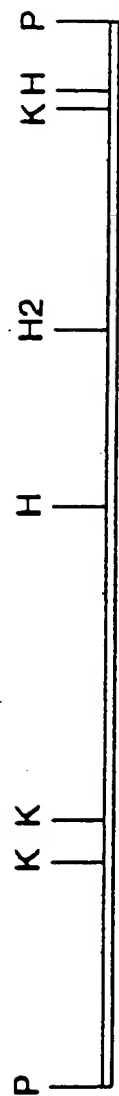



FIG. 2



Probe 1  

Probe 2 

Probe 3 

FIG. 3

pHT 671

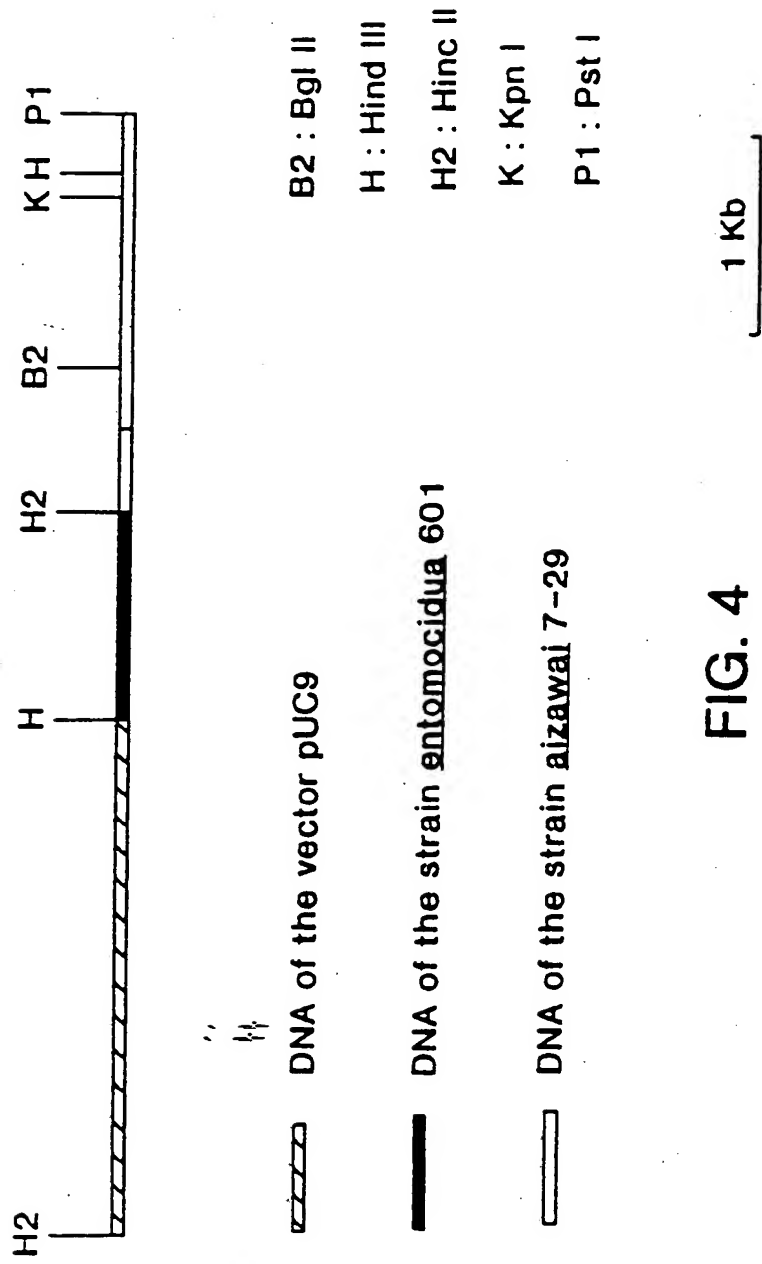


FIG. 4

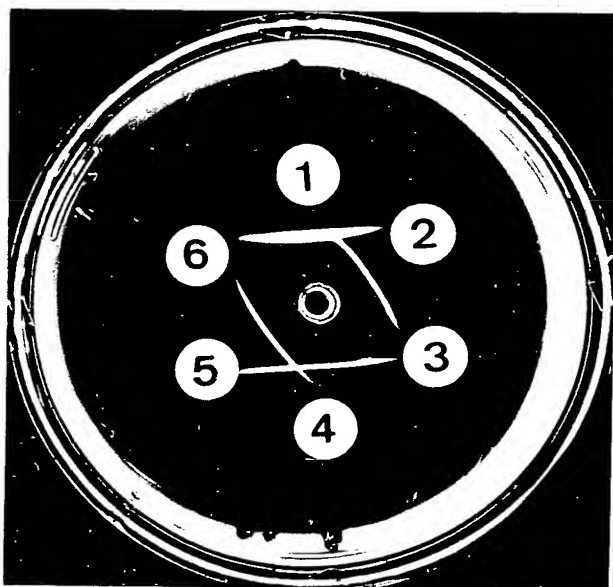


FIG. 5A

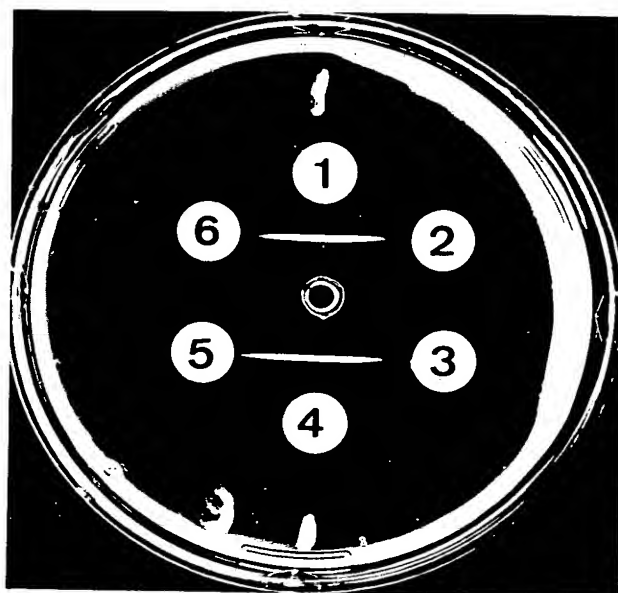


FIG. 5B

VERIFICATION OF A TRANSLATION
(VERIFICATION D'UNE TRADUCTION)

I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below :

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application n° PCT/FR 8800292 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true ; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date December 4, 1989

Full name of the translator JARVIS DEREL
(Nom et prénom du traducteur)

Signature of the translator Derel Jarvis
(Signature du traducteur)

Post Office Address (Adresse postale) 7 rue d'URSEL
..... 67000 STRASBOURG

filed
12/11/89

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		Cote du dossier du déposant ou du mandataire <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">0645 B</div>
Demande internationale N° <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">PCT/FR88/00 292</div>	Date de dépôt international <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">09.06.1988</div>	
Office récepteur <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">RO / FR</div>	Date de priorité revendiquée <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">10.06.1987</div>	
Déposant (Nom) <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">INSTITUT PASTEUR ET AL</div>		
BASE DU RAPPORT		
<p>1. MODIFICATIONS ET/OU RECTIFICATIONS¹ — Les modifications et/ou les rectifications faites auprès de la présente administration chargée de l'examen préliminaire international concernant les revendications, la description et/ou les dessins de la demande internationale identifiée ci-dessus sont annexées à ce rapport.</p> <p>a. <input type="checkbox"/> Le présent rapport a été établi sur la base des documents de demande suivants:</p> <div style="margin-left: 20px;"> <input checked="" type="checkbox"/> les documents de la demande tels que déposés </div> <div style="margin-left: 20px; display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input type="checkbox"/> description, pages _____ description, pages _____ description, pages _____ description, pages _____ </div> <div> telle que déposée à l'origine _____ déposée par votre lettre du _____ déposée par votre lettre du _____ déposée par votre lettre du _____ </div> </div> <div style="margin-left: 20px; display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input type="checkbox"/> revendication(s) _____ revendication(s) _____ revendication(s) _____ revendication(s) _____ </div> <div> telle(s) que déposée(s) à l'origine _____ déposée(s) par votre lettre du _____ déposée(s) par votre lettre du _____ déposée(s) par votre lettre du _____ </div> </div> <div style="margin-left: 20px; display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input type="checkbox"/> dessins, feuille fig. _____ dessins, feuille fig. _____ </div> <div> tels que déposés à l'origine _____ déposés par votre lettre du _____ </div> </div> <p>b. <input type="checkbox"/> Les modifications ont entraîné la suppression des feuilles suivantes:</p> <p>c. <input type="checkbox"/> Le présent rapport a été établi comme si les modifications mentionnées sur la feuille complémentaire n'avaient pas été faites, étant donné que, pour les raisons indiquées, elles ont été considérées comme étant au-delà de l'exposé de l'invention tel que déposé.</p> <p>2. PRIORITÉ²</p> <p>a. Le présent rapport a été établi comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait de la non-remise dans les délais les documents exigés suivants:</p> <div style="margin-left: 20px;"> <input type="checkbox"/> une copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée. <input type="checkbox"/> une traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée. </div> <p>b. <input type="checkbox"/> Le présent rapport a été établi comme si aucune priorité n'avait été revendiquée du fait que la revendication de priorité a été estimée non valable.</p> <p>Par suite, pour les besoins de ce rapport, la date de dépôt international indiquée ci-dessus est considérée comme étant la date pertinente.</p>		
<p><small>¹ Lorsque des feuilles de remplacement sont annexées au présent rapport, une traduction de ces feuilles de remplacement doit être fournie aux offices états dans le délai applicable selon l'article 39.1) du PCT.</small></p>		

INFORMATI NS COMPLÉMENTAIRES (Suite de la première feuille)

BASE DU RAPPORT (Suite)

3. UNITÉ DE L'INVENTION³ — La demande internationale ne satisfait pas à l'exigence d'unité de l'invention.

a. En réponse à une invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant:

- ☐ a limité les revendications.
- ☐ a payé des taxes additionnelles.
- ☐ a payé des taxes additionnelles sous réserve. Lorsque le déposant le demande, le texte des réserves ainsi que la décision prise à ce sujet sont joints à ce rapport.
- ☐ n'a ni limité les revendications, ni payé de taxes additionnelles.

b. ☐ Il n'a pas été envoyé d'invitation. L'avis de la présente administration chargée de l'examen préliminaire international est que la demande internationale ne satisfait pas aux exigences d'unité de l'invention, pour les motifs suivants. (préciser)

c. Par suite, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet de l'examen préliminaire international pour l'établissement de ce rapport:

- ☐ l'ensemble de la demande.
- ☐ les parties de la demande relatives aux revendications limitées, à savoir les revendications N° _____.
- ☐ les parties relatives à l'invention principale, à savoir les revendications N° _____.

4. NON-ÉTABLISSEMENT DU RAPPORT SUR LES QUESTIONS DE NOUVEAUTÉ, D'ACTIVITÉ INVENTIVE OU D'APPLICATION INDUSTRIELLE⁴

Les questions de savoir si l'invention revendiquée se révèle nouvelle, présente une activité inventive et s'avère susceptible d'application industrielle n'ont pas été abordées pour les motifs indiqués et en ce qui concerne:

- a. ☐ toute la demande internationale
- b. ☒ les revendications N° 1-13, 15-19, 21-36
pour les motifs suivants: voir page jointe

☐ Ladite demande internationale ou lesdites revendications N° _____ sont relatives à l'objet suivant à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen. (préciser)

- ☒ La description, les revendications ou les dessins (en indiquer les éléments) ou les revendications N° 1-13, 15-19, 21-36 ne sont pas clairs de sorte qu'une opinion valable ne peut être formée.
- ☐ Les revendications ou les revendications N° _____ ne se fondent pas de façon adéquate sur la description de sorte qu'une opinion valable ne peut être formée.
- ☐ Les revendications N° _____ sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément à la deuxième et à la troisième phrases de la règle 6.4.a) du PCT.

CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification s'appliquent, les indiquer tous)¹

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et selon la CIB

C12N 15/00 ; C12N 1/20 ; C12P 21/02 ; A01N 63/00

DÉCLARATION MOTIVÉE QUANT AUX REVENDICATIONS SATISFAISANT AUX CRITÈRES DE NOUVEAUTÉ (N),
D'ACTIVITÉ INVENTIVE (IS), D'APPLICATION INDUSTRIELLE (IA);²
CITATION DES DOCUMENTS³ ET EXPLICATIONS⁴ ÉTAYANT LA DÉCLARATION

NUMÉRO DE REVEN- DICA- TION	DÉCLARA- TION (CRITÈRES)	CITATIONS DES DOCUMENTS ET EXPLICATIONS
14,20 N	AI: oui IA	Les séquences spécifiques selon la Revendication 14 et les polypeptides correspondants selon la Revendication 20 sont nouveaux (Article 33(2) PCT), et la détermination desdites séquences ne découle pas d'une manière évidente de l'état de la technique (Article 33(3) PCT).

DIVULGATIONS NON ÉCRITES ⁹			
Type de divulgation non écrite	Date de la divulgation écrite qui se réfère à la divulgation non écrite	Date de la divulgation non écrite	

MENTION DE CERTAINS DOCUMENTS PUBLIÉS ¹⁰			
Demande/brevet	Date de publication	Date de dépôt	Date de priorité (valablement revendiquée)
EP-A-0 228 838	15.07.1987	09.12.1986	12.12.1985 05.09.1985

MENTION DE CERTAINES IRRÉGULARITÉS DANS LA DEMANDE INTERNATIONALE ¹¹
Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu, ont été constatées:

MENTION DE CERTAINES OBSERVATIONS RELATIVES A LA DEMANDE INTERNATIONALE ¹²
Les observations suivantes ont été indiquées en ce qui concerne la clarté des revendications, de la description et des dessins ou la question de savoir si les revendications se basent entièrement sur la description.
Voir pages jointes

CERTIFICAT ¹³	
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire international 27.12.1988	Date d'achèvement du rapport d'examen préliminaire international 24.06.88
Administration chargée de l'examen préliminaire international O.E.B.	Signature du fonctionnaire autorisé R. Großkopf

Ces notes sont destinées à faciliter l'utilisation du présent formulaire. Pour plus de renseignements, se référer au texte du Traité de coopération en matière de brevets et aux textes du règlement d'exécution et des instructions administratives de ce traité. En cas de divergence entre ces notes et lesdits textes, ce sont ces derniers qui s'appliquent. On entend par « article » les articles du traité par « règle » les règles du règlement d'exécution et par « instruction » les instructions administratives.

1 « Si les revendications ont été modifiées, le rapport est établi sur la base des revendications telles que modifiées. » (règle 70.2.a))
« Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international considère qu'une modification va au-delà de l'exposé de l'invention figurant dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée, le rapport est établi comme si cette modification n'avait pas été faite, et le rapport l'indique. Il indique également les raisons pour lesquelles ladite administration considère que la modification va au-delà dudit exposé. » (règle 70.2.c))

« Il est indiqué dans le rapport si des modifications ont été faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international. Lorsqu'une modification a abouti à la suppression d'une feuille entière, le fait est aussi précisé dans le rapport. » (règle 70.11)

« Si les revendications, la description ou les dessins ont été modifiés auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international, chaque feuille de remplacement visée à la règle 66.8.a) est annexée au rapport. Les feuilles de remplacement auxquelles d'autres feuilles de remplacement ont été substituées ultérieurement et les lettres visées à la règle 66.8.a) ne sont pas annexées. » (règle 70.16)

2 « Si, conformément à la règle 66.7.a) ou b), le rapport est établi comme si la priorité n'avait pas été revendiquée, le rapport doit le préciser. » (règle 70.2.b))

« Si une copie de la demande dont la priorité est revendiquée dans la demande internationale est nécessaire à l'administration chargée de l'examen préliminaire international, le Bureau international la lui communique à bref délai, sur requête. Si cette copie n'est pas remise à l'administration chargée de l'examen préliminaire international parce que le déposant ne s'est pas conformé aux prescriptions de la règle 17.1, le rapport d'examen préliminaire international peut être établi comme si la priorité n'avait pas été revendiquée. » (règle 66.7.a))

« Si la demande dont la priorité est revendiquée dans la demande internationale est rédigée dans une langue autre que la ou les langues de l'administration chargée de l'examen préliminaire international, cette dernière peut inviter le déposant à lui remettre une traduction dans ladite langue ou dans l'une desdites langues dans les deux mois suivant la date de l'invention. Si la traduction n'est pas remise dans ce délai, le rapport d'examen préliminaire international peut être établi comme si la priorité n'avait pas été revendiquée. » (règle 66.7.b))

Voir également la règle 70.10 dans la note 10 ci-dessous.

3 « Le rapport indique si le déposant a payé des taxes additionnelles pour l'examen préliminaire international, ou si la demande internationale ou l'examen préliminaire international a été limité selon l'article 34.3). En outre, lorsque l'examen préliminaire international a été effectué sur la base de revendications limitées (article 34.3.a)) ou de l'invention principale seulement (article 34.3.c)), le rapport précise les parties de la demande internationale sur lesquelles l'examen préliminaire international a porté. » (règle 70.13)

La règle 68 intitulée « Absence d'unité de l'invention (examen préliminaire international) » s'énonce comme suit:

« 68.1 Pas d'invitation à limiter ou à payer

Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention et décide de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, elle établit le rapport d'examen préliminaire international, sous réserve de l'article 34.4.b), pour la demande internationale entière, mais elle indique dans ce rapport que, selon son opinion, il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention et elle spécifie les motifs pour lesquels elle considère que cette exigence n'est pas satisfaisante. »

« 68.2 Invitation à limiter ou à payer

Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention et décide d'inviter le déposant, au choix de ce dernier, à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, elle indique au moins une possibilité de limitation qui, à son avis, satisfait à cette exigence; elle précise le montant des taxes additionnelles et spécifie les motifs pour lesquels elle considère que l'exigence d'unité de l'invention n'est pas satisfaite. Elle fixe en même temps un délai, qui tient compte des circonstances du cas d'espèce, pour donner suite à l'invitation; ce délai ne peut être inférieur à un mois ni supérieur à deux mois à compter de la date de l'invitation. »

« 68.3 Taxes additionnelles

a) Le montant des taxes additionnelles pour l'examen préliminaire international, prévues à l'article 34.3.a), est fixé par l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international.

b) Les taxes additionnelles pour l'examen préliminaire international, prévues à l'article 34.3.a), doivent être payées directement à l'administration chargée de l'examen préliminaire international.

c) Tout déposant peut payer les taxes additionnelles sous réserve, c'est-à-dire en y joignant une déclaration motivée tendant à démontrer que la demande internationale remplit la condition d'unité de l'invention ou que le montant des taxes additionnelles demandées est excessif. Un comité de trois membres — ou toute autre instance spéciale — de l'administration chargée de l'examen préliminaire international ou toute autorité supérieure com-

pétente, examine la réserve et, dans la mesure où il estime que la réserve est justifiée, ordonne le remboursement, total ou partiel, des taxes additionnelles au déposant. Sur requête du déposant, le texte de la réserve et celui de la décision sont annexés au rapport d'examen préliminaire international et notifiés aux offices élus.

d) Le Comité de trois membres, l'instance spéciale ou l'autorité supérieure mentionnée à l'alinéa c) ne doit pas comprendre le fonctionnaire qui a pris la décision faisant l'objet de la réserve. »

« 68.4 Procédure en cas de limitation insuffisante des revendications

Si le déposant limite les revendications d'une manière qui ne suffit pas pour satisfaire à l'exigence d'unité de l'invention, l'administration chargée de l'examen préliminaire international procède conformément à l'article 34.3.c)). »

68.5 Invention principale

En cas de doute sur la question de savoir quelle est l'invention principale aux fins de l'article 34.3.c)), l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications est considérée comme l'invention principale. »

4 « Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime:

i) que la demande internationale concerne un objet à l'égard duquel elle n'est pas tenue, selon le règlement d'exécution, d'effectuer un examen préliminaire international et décide en l'espèce de ne pas effectuer un tel examen, ou

ii) que la description, les revendications ou les dessins ne sont pas clairs, ou que les revendications ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'une opinion valable ne peut être formée au sujet de la nouveauté, de l'activité inventive (non-évidence) ou de l'application industrielle de l'invention dont la protection est demandée,

elle n'aborde pas les questions mentionnées à l'article 33.1) et fait connaître au déposant cette opinion et ses motifs. » (article 34.4.a))

« Si l'une des situations mentionnées au sous-alinéa a) n'existe qu'à l'égard de certaines revendications ou en relation avec certaines revendications, les dispositions dudit sous-alinéa a) ne s'appliquent qu'à l'égard de ces revendications. » (article 34.4.b))

« Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime, lors de l'établissement du rapport d'examen préliminaire international, que l'une quelconque des situations mentionnées à l'article 34.4.a) existe, le rapport en fait état et indique les motifs. » (article 35.3.a))

« Si l'une des situations mentionnées à l'article 34.4.b) existe, le rapport d'examen préliminaire international contient, pour les revendications en question, l'indication prévue au sous-alinéa a) et, pour les autres revendications, la déclaration indiquée à l'alinéa 2). » (article 35.3.b))

« ... Lorsque la législation nationale de l'office national qui agit en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international ne permet pas que les revendications dépendantes multiples soient rédigées d'une manière différente de celle qui est prévue dans les deuxième et troisième phrases de la règle 6.4.a), l'administration chargée de l'examen préliminaire international peut, si des revendications ne sont pas rédigées de cette manière, appliquer l'article 34.4.b).... » (règle 66.2.a))

La règle 67 intitulée « Objet selon l'article 34.4.a) i) » se lit comme suit:

« 67.1 Définition

Aucune administration chargée de l'examen préliminaire international n'a l'obligation de procéder à l'examen préliminaire international à l'égard d'une demande internationale dont l'objet, et dans la mesure où l'objet est l'un des suivants:

i) théories scientifiques et mathématiques;

ii) variétés végétales, races animales, procédés essentiellement biologiques d'obtention de végétaux ou d'animaux, autres que procédés microbiologiques et produits obtenus par ces procédés;

iii) plans, principes ou méthodes en vue de faire des affaires, de réaliser des actions purement intellectuelles ou de jouer;

iv) méthodes de traitement du corps humain ou animal par la chirurgie ou la thérapie, ainsi que méthodes de diagnostic;

v) simples présentations d'informations;

vi) programmes d'ordinateurs dans la mesure où l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas outillée pour procéder à un examen préliminaire international au sujet de tels programmes. »

5 « Le rapport répète le classement indiqué selon la règle 43.3 [classement de l'objet de l'invention dans le rapport de recherche internationale] si l'administration chargée de l'examen préliminaire international maintient ce classement. » (règle 70.5.a))

« Sinon, l'administration chargée de l'examen préliminaire international indique le classement qu'elle considère comme correct, au minimum selon la classification internationale des brevets. » (règle 70.5.b))

6 « Le rapport d'examen préliminaire international ne contient aucune déclaration quant à la question de savoir si l'invention dont la protection est demandée est ou semble être brevetable ou non au regard d'une législation nationale quelconque. Il déclare, sous réserve de l'alinéa 3), en relation avec chaque revendication, si cette revendication semble répondre aux critères de nouveauté, d'activité inventive (non-évidence) et d'application industrielle, tels que ces critères sont définis, aux fins de l'examen préliminaire international, à l'article 33.1) à 4). Cette déclaration doit être accompagnée de la citation des documents qui semblent étayer la conclusion déclarée, et de toutes explications qui peuvent s'imposer en l'espèce. A cette déclaration doivent également être jointes les autres observations prévues par le règlement d'exécution. » (article 35.2))

« La déclaration mentionnée à l'article 35.2) consiste en « OUI » ou « NON », ou l'équivalent de ces mots dans la langue du rapport, ou un signe

appropriée spécifiée dans les instructions administratives et est, le cas échéant, accompagnée des citations, explications et observations mentionnées à la dernière phrase de l'article 35.2.) » (règle 70.6.a))

« Si l'on n'est pas satisfait à l'un quelconque des trois critères mentionnés à l'article 35.2) (à savoir la nouveauté, l'activité inventive (non-évidence) et l'application industrielle), la déclaration est négative. Si, dans un tel cas, il est satisfait à l'un ou à deux de ces critères pris séparément, le rapport précise celui ou ceux auxquels il est ainsi satisfait. » (règle 70.6.b))

7 Voir l'article 35.2) dans la note précédente.

« Le rapport cite les documents considérés comme pertinents pour étayer les déclarations faites selon l'article 35.2.) » (règle 70.7.a))

« Les dispositions de la règle 43.5.b) et c) s'appliquent également au rapport. » (règle 70.7.b))

« La méthode d'identification de chaque document cité est fixée dans les instructions administratives. » (règle 43.5.b))

« Si certains passages seulement du document cité sont pertinents ou particulièrement pertinents, ces passages sont identifiés — par exemple en indiquant la page, la colonne ou les lignes où figure le passage considéré. » (règle 43.5.e))

« Tout document cité dans le rapport de recherche internationale est identifié, conformément à la règle 43.5.b), en indiquant les éléments suivants dans l'ordre ci-après :

a) S'il s'agit d'un document de brevet (les documents de brevets étant constitués par les brevets au sens de l'article 2 ii) ainsi que par les demandes publiées y relatives):

- i) l'office qui a publié le document, selon le code à deux lettres figurant à l'annexe B;
- ii) le type du document, selon les symboles appropriés prévus dans le Code normalisé pour l'identification de différents types de documents de brevets (ST. 16);
- iii) le numéro attribué au document par l'office de publication; (pour les documents de brevets japonais, l'indication de l'année du règne de l'Empereur doit précéder le numéro de série du document de brevet);
- iv) le nom du titulaire du brevet ou du déposant (en majuscules et, le cas échéant, sous forme abrégée);
- v) la date de publication du document de brevet cité, telle qu'elle figure sur ce document; et
- vi) le cas échéant, les pages, les colonnes ou les lignes où se trouvent les passages pertinents ou les figures pertinentes des dessins.

(L'exemple suivant illustre la façon de citer un document de brevet conformément aux dispositions de l'alinéa a) ci-dessus:

JP, B. 50-14535 (NCR CORPORATION) 28 mai 1975 (28.05.75), voir colonne 4, lignes 3 à 27.)

b) S'il s'agit d'un livre ou d'une autre publication éditée isolément:

- i) le nom de l'auteur;
- ii) le titre (en précisant, le cas échéant, l'édition et/ou le volume);
- iii) l'année de la publication (lorsque celle-ci coïncide avec l'année de la demande internationale ou de la revendication de priorité, l'administration chargée de la recherche internationale doit s'efforcer de déterminer le mois et, si besoin est, le jour de la publication, et d'indiquer ces données dans le rapport de recherche internationale);
- iv) le nom de l'éditeur;
- v) s'il est connu, le lieu de publication (lorsque le livre ou la publication éditée isolément précise uniquement l'adresse de l'éditeur, cette dernière doit être indiquée comme lieu de publication); et
- vi) le cas échéant, les pages, les colonnes ou les lignes où se trouvent les passages pertinents ou les figures pertinentes des dessins.

(L'exemple suivant illustre la façon de citer un livre ou une autre publication éditée isolément, conformément aux dispositions de l'alinéa b) ci-dessus:

H. Walton, « Microwave Quantum Theory », volume 2, publié en 1973, par Sweet and Maxwell (Londres), voir pages 138 à 192 et plus particulièrement les pages 146 à 148.)

c) S'il s'agit d'un article publié dans un périodique ou une autre publication en série:

- i) le titre du périodique ou de la publication en série;
- ii) le numéro du volume et la date du fascicule qui contient l'article;
- iii) s'il est connu, le lieu de publication (lorsque le périodique ou la publication en série précise uniquement l'adresse de l'éditeur, cette dernière doit être indiquée comme lieu de publication);
- iv) l'auteur et le titre de l'article ainsi que le numéro des pages auxquelles commence et se termine l'article; et
- v) le cas échéant, les pages, les colonnes ou les lignes où se trouvent les passages pertinents ou les figures pertinentes des dessins.

(L'exemple suivant illustre la façon de citer un article publié dans un périodique ou une autre publication en série, conformément aux dispositions de l'alinéa c) ci-dessus:

IBM Technical Disclosure Bulletin volume 17, N° 5, publié en octobre 1974 (Armonk, New York), J. G. Drop, « Integrated Circuit Personalization at the Module Level », voir pages 1344 et 1345.)

d) S'il s'agit d'abrévés:

- i) l'identification du document contenant l'abrége, de la manière indiquée aux alinéas a), b) ou c), respectivement, selon que l'abrége figure dans un document de brevet, dans un livre ou une publication éditée isolément, ou dans un article publié dans un périodique ou une autre publication en série;
- ii) au cas où l'abrége n'accompagne pas le document complet qui lui a servi de base, l'identification de l'abrége et du document complet sur la base des données bibliographiques disponibles à cet égard.

(L'exemple suivant illustre la façon de citer un abrége conformément aux dispositions de l'alinéa d) ii) ci-dessus:

Chemical Abstracts, volume 75, N° 20, publié le 15 novembre 1971 (Columbus, Ohio, U.S.A.), D. I. Shetelov, « Surface Effects During Metal Fatigue », voir page 163, colonne 1, l'abrége N° 120718k, Fiz.-Khim. Mekh. Mater. 1971, 7-11 (Russ.).) (Instruction 503)

8 Voir l'article 35.2) dans la note ci-dessus.

« Les instructions administratives contiennent des principes directeurs pour les cas où les explications mentionnées à l'article 35.2) devraient ou ne devraient pas être données, ainsi que pour la forme de ces explications. Ces principes directeurs doivent se baser sur les principes suivants:

- i) des explications doivent être données chaque fois que la déclaration est négative à l'égard d'une revendication quelconque;
- ii) des explications doivent être données chaque fois que la déclaration est positive, sauf si les raisons qui ont conduit à citer un document quelconque sont faciles à imaginer sur la base de la consultation du document cité;
- iii) en règle générale, des explications doivent être données dans le cas prévu à la dernière phrase de la règle 70.6.b). » (règle 70.8)

« Les explications selon la règle 70.8 doivent indiquer clairement celui des trois critères visés à l'article 35.2), pris séparément, auquel s'applique tout document cité et préciser, en se référant aux documents cités, les raisons qui ont amené à conclure qu'il a été satisfait ou non à l'un quelconque desdits critères. » (Instruction 604)

9 « Toute divulgation non écrite visée dans le rapport en raison de la règle 64.2 est mentionnée par l'indication de son genre, par la date à laquelle la divulgation écrite qui se réfère à la divulgation non écrite a été rendue accessible au public et par la date à laquelle cette dernière a été faite publiquement. » (règle 70.9)

« Dans les cas où la mise à la disposition du public a eu lieu par le moyen d'une divulgation orale, d'une utilisation ou d'une exposition, ou par d'autres moyens non écrits (« divulgation non écrite ») avant la date pertinente telle que définie à la règle 64.1.b), et où la date de cette divulgation non écrite est indiquée dans une divulgation écrite qui a été rendue accessible au public après la date pertinente, la divulgation non écrite n'est pas considérée comme faisant partie de l'état de la technique aux fins de l'article 33.2) et 3). Toutefois, le rapport d'examen préliminaire international doit mentionner une telle divulgation non écrite de la manière prévue à la règle 70.9. » (règle 64.2)

10 « Toute demande publiée et tout brevet visés dans le rapport en raison de la règle 64.3 sont mentionnés en tant que tels; le rapport indique leur date de publication, leur date de dépôt et leur date de priorité revendiquée (le cas échéant). A l'égard de la date de priorité d'un tel document, le rapport peut indiquer que l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que cette date n'a pas été valablement revendiquée. » (règle 70.10)

« Lorsqu'une demande ou un brevet, qui ferait partie de l'état de la technique aux fins de l'article 33.2) et 3) s'il avait été publié avant la date pertinente mentionnée à la règle 64.1, a été publié, en tant que tel, après la date pertinente mais a été déposé avant la date pertinente ou revendiqué la priorité d'une demande antérieure déposée avant la date pertinente, cette demande publiée ou ce brevet publié n'est pas considéré comme faisant partie de l'état de la technique aux fins de l'article 33.2) et 3). Toutefois, le rapport d'examen préliminaire international doit mentionner une telle demande ou un tel brevet de la manière prévue à la règle 70.10. » (règle 64.3)

11 « Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'au moment où elle prépare le rapport:

- i) la demande internationale tombe sous le coup de la règle 66.2.a) iii) [la demande internationale est incorrecte quant à sa forme ou à son contenu selon le traité ou son règlement d'exécution], elle l'indique dans le rapport en motivant son opinion;
- ii) la demande internationale appelle l'une des observations mentionnées à la règle 66.2.a) v) [observations relatives à la clarté des revendications, de la description ou des dessins, ou à la question de savoir si les revendications se basent entièrement sur la description], elle peut l'indiquer dans le rapport et, si elle le fait, elle motive son opinion. » (règle 70.12)

12 Voir la règle 70.12.b) dans la note précédente.

- 1). (a) Une séquence de nucléotides étant un produit chimique elle doit être en principe définie par sa structure.

Une définition par le résultat recherché ou par la fonction n'est pas admissible (voir p.e. revendications 1,2,8 et 9; les expressions "capable d'exprimer", "capable d'hybrider", "capable de former un complexe immunologique").

Les mêmes remarques sont aussi valables pour la définition des sondes (voir p.e. revendications 2 ou 9) ou d'un polypeptide (voir revendication 19).

Bien qu'il soit, exceptionnellement, possible de définir un produit chimique à l'aide de plusieurs paramètres, ces paramètres doivent néanmoins définir le produit précisément. En outre il est nécessaire que la définition par des paramètres permet la distinction des produits connus.

(b) Dans le cas présent il faut donc délimiter clairement l'objet des revendications présentes par rapport aux séquences de nucléotide et aux polypeptides qui sont décrits dans l'art antérieur (voir notamment EP-A-0224331 (document 1) et Molecular Biology of Microbial Differentiation, Proc. 9th Int. Spore Conf., Asilomar (CA), US, 3-6 September 1984, American Society for Microbiology, pages 217-224, Document 2).

Au vu des objections mentionnées au-dessus une définition de la séquence présente par une combinaison des revendications 1,3 et 5 semblerait acceptable sous l'Article 6 PCT.

(c) Des dénominations arbitraires ne sont pas acceptables dans une revendication (voir p.e. revendications 2,16,22 ou 26).

(d) Dans les procédés selon les revendications 21-27 la

caractéristique essentielle est aussi la séquence de nucléotides utilisée pour la "réalisation d'une hybridation". En conséquence il faut que cette séquence soit définie dans ces revendications conformément aux objections mentionnées au-dessus.

(e) En ce qui concerne les revendications qui se réfèrent aux revendications mentionnées ci-dessus, leur clarté dépend d'une définition suffisamment claire de l'objet des revendications indépendantes.

(f) L'objet des revendications 32-36 n'est pas supporté par des exemples mais seulement par des passages spéculatifs. Il semble donc que l'objet de ces revendications n'est pas exposé de façon suffisamment claire et complète pour qu'un homme du métier puisse l'excuter.

TRAITE DE COOPERATION
EN MATIERE DE BREVETS

No DE LA DEMANDE INTERNATIONALE: PCT/FR88/00292

INFORMATIONS RELATIVES AUX
OFFICES ELUS QUI ONT REÇU
NOTIFICATION DE LEUR ELECTION
émise conformément à la règle
61.3 du PCT

Destinataire:

PEAUCELLE, Chantal
S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud
67, boulevard Haussmann
F-75008 Paris
FRANCE

REQUIS

DATE D'EXPEDITION DE CETTE
NOTIFICATION:
19 janvier 1989 (19.01.89)

COTE DU DOSSIER DU DEPOSANT OU
DU MANDATAIRE:
06458

Expéditeur:

Le Bureau international de l'OMPI
1211 Genève 20
Suisse

DEPOSANT (NOM):
INSTITUT PASTEUR etc.

DATE DU DEPOT INTERNATIONAL:
09 juin 1988 (09.06.88)

Le Bureau international a notifié, comme le prévoit l'article 31.7) du PCT, chacun des offices suivants de son élection:

OFFICES NATIONAUX DE: JP,US
QA

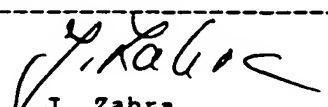
Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale", avant l'expiration d'un délai de trente mois à compter de la date de priorité, auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus, à condition que l'élection correspondante ait été effectuée avant l'expiration du 19ème mois à compter de la date de priorité. Ceci doit être effectué en accomplissant les actes mentionnés à l'article 39.1.a) du PCT (c'est-à-dire, payer la ou les taxes nationales et fournir, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale), ainsi que, le cas échéant, en transmettant la traduction de toute annexe au rapport d'examen préliminaire international conformément à l'article 36.3)b) et à la règle 74.1 du PCT.

Les Offices suivants ont fixé des délais plus tardifs:

- AU et BG: 31 mois à compter de la date de priorité;
- EP: la taxe nationale, la ou les taxes de désignation, la taxe de recherche et toute taxe de revendication (mais pas la taxe d'examen ni, le cas échéant, toute taxe de renouvellement exigible avant l'expiration du délai de 30 mois) peuvent être payées dans le mois qui suit l'expiration du délai de 30 mois.

Des informations détaillées concernant les actes à accomplir ainsi que les délais applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT.

Formulaire PCT/IB/332 (juin 1988).


J. Zahra
(fonctionnaire autorisé)

0645 HH

Traité l'arrêté,

TRAITE DE COOPERATION
EN MATIERE DE BREVETS

No DE PUBLICATION INTERNATIONALE: W088/09812
No DE LA DEMANDE INTERNATIONALE: PCT/FR88/00292

NOTICE

INFORMANT LE DEPOSANT DE LA
COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE AUX OFFICES
DESIGNES

émise en vertu de la règle
47.1.c), première phrase, du
PCT

Destinataire:

PEAUCELLE, Chantal
S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud
67, boulevard Haussmann
F-75008 Paris
FRANCE

DATE D'EXPEDITION DE CETTE NOTICE
15 décembre 1988 (15.12.88)

COTE DU DOSSIER DU DEPOSANT OU
DU MANDATAIRE
06458

Expéditeur:
Le Bureau international de l'OMPI
1211 Genève 20
Suisse

Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cette notice, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20 du PCT, la demande internationale visée ci-dessus aux offices désignés suivants:

aux offices nationaux de JP,US, et à l'OA

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chaque office désigné en accomplissant, dans le délai applicable selon l'article 22 ou 39.1 du PCT, les actes qui y sont visés.

En vertu de la règle 47.1.c) du PCT, troisième phrase, chaque office désigné a été informé, séparément de la communication de la demande internationale, de l'envoi de la présente notice et de la date à laquelle elle a été envoyée.

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR DES POLYPEPTIDES
DOTES D'UNE ACTIVITE LARVICIDE VIS-A-VIS DE LEPIDOPTERES

5 L'invention a pour objet des séquences de nucléotides codant pour des polypeptides dotés d'une activité larvicide vis-à-vis de lépidoptères.

Elle vise plus spécialement des moyens, en particulier des séquences nucléotidiques, des polypeptides ou encore des vecteurs, ou des souches bactériennes, modifiés par ces séquences et exprimant des polypeptides permettant de préparer des compositions larvicides actives vis-à-vis de lépidoptères, de préférence vis-à-vis de Spodoptera littoralis (ci-après S. littoralis) ou Mamestra brassicae (ci-après désignée par M. brassicae) ou capables de transformer les plantes à traiter en leur conférant ce type d'activité.

On sait que la plupart des isolats de B. thuringiensis présentent une activité toxique à l'égard de larves de plus de cent espèces de lépidoptères.

20 Cette activité résulte, de la capacité des souches de B. thuringiensis à synthétiser, au moment de la sporulation, des inclusions cristallines de nature protéique, ou δ -endotoxines, sous le contrôle d'un ou plusieurs types de gènes.

25 On a montré que l'activité de ces polypeptides est contenue dans la moitié NH_2 -terminale ou N-terminale de la protéine.

Les travaux réalisés ont montré la spécificité élevée des δ -endotoxines vis-à-vis de larves d'une espèce donnée.

30 En raison de cette spécificité élevée, de nombreuses espèces de lépidoptères, notamment de la famille des Noctuelles, ne réagissent que faiblement aux préparations commerciales de B. thuringiensis disponibles.

35 Il en est ainsi en particulier de l'espèce

Handwritten: 12/1/85

S.littoralis, insecte polyphage qui constitue le principal parasite du coton et d'autres cultures industriellement importantes. Parmi ces cultures, on citera le maïs, le ricin, le tabac, l'arachide, des plantes fourragères, telles que le trèfle ou la luzerne, ou encore des produits maraichers comme le chou ou la tomate.

On conçoit donc l'intérêt de disposer de moyens ciblant spécifiquement et efficacement la famille des Noctuelles et notamment S.littoralis ou M.brassicae.

Les gènes de δ -endotoxines identifiés à ce jour, ne codent pas pour un polypeptide actif préférentiellement à l'égard de S.littoralis.

La recherche par les inventeurs d'une séquence de nucléotides codant pour un polypeptide actif de préférence vis-à-vis des Noctuelles, plus spécialement vis-à-vis de S.littoralis, les a conduits à étudier les isolats naturels de deux souches de B.thuringiensis dont l'activité larvicide sur S.littoralis apparaît plus élevée que celle des préparations industrielles faites à partir d'autres souches de B.thuringiensis.

Il s'agit des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01.

L'étude de ces isolats a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs gènes de δ -endotoxines de structures différentes et de spécificités différentes, dont deux gènes préférentiellement actifs contre P.brassicae mais peu actifs vis-à-vis de la Noctuelle du coton et un gène inactif vis-à-vis de P.brassicae et de S.littoralis.

En étudiant l'ADN total de ces isolats et en effectuant des hybridations appropriées, suivies du clonage des fragments identifiés par hybridation, les inventeurs ont constaté qu'il est possible d'isoler des séquences nucléotidiques impliquées dans des gènes de δ -endotoxines codant pour des polypeptides actifs, de

préférence contre S.littoralis.

L'invention a donc pour but de fournir des séquences nucléotidiques capables de coder pour au moins la partie NH_2 -terminale d'une δ -endotoxine toxique contre les Noctuelles, de préférence contre S.littoralis ou M.brassicae.

Elle a également pour but de fournir un polypeptide toxique à l'égard des Noctuelles.

L'invention vise en outre un procédé d'obtention d'une telle séquence et d'un polypeptide présentant l'activité recherchée ainsi que les moyens intermédiaires tels que vecteurs et souches bactériennes utilisables pour l'obtention du polypeptide.

L'invention vise de plus les applications de ces séquences et polypeptides pour l'élaboration de compositions larvicides à l'égard des Noctuelles, en particulier de S.littoralis et pour la transformation des plantes susceptibles d'être infectées par ces larves.

L'invention concerne une séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de façon spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de S.littoralis.

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence nucléotidique est caractérisée en ce qu'elle est portée par une séquence de nucléotides d'environ 3kb telle qu'obtenue par recombinaison génétique in vitro de séquences de nucléotides de B.thuringiensis capables de s'hybrider avec des sondes 1, 2 et 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2. Le fragment de 3kb correspond plus spécialement au fragment de restriction HindIII-PstI.

Les séquences de nucléotides de l'invention

sont, en outre, caractérisées en ce qu'elles comportent des sites dans l'ordre suivant : HindIII - HincII - BglII KpnI - HindIII - PstI.

De manière préférée, ces séquences de nucléotides sont obtenues par recombinaison génétique in vitro de séquences d'ADN provenant d'au moins une souche de B.thuringiensis. Dans une variante de réalisation de l'invention, deux souches différentes de B.thuringiensis sont mises en oeuvre.

Des souches de B.thuringiensis particulièrement appropriées pour l'obtention de ces séquences de nucléotides sont les souches correspondant à aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, déposées le 21 Avril 1987 respectivement sous les n° 1-661 et n° I-660 à la Collection nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) à Paris.

D'une manière avantageuse, les séquences de nucléotides de l'invention codent pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides présentant l'activité larvicide à l'égard de S.littoralis.

Une séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant :

30

35

GTC ⁵²TAC TTG ACA GGG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA
 TAT GGG GCA TAT ATT GAT ATT ¹¹²TTA TAA AAT TTG TTA CGT ¹⁷²TTT
 TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA TCG TGG
 TAA TGA AAA ACA GTA ²³²TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA
 ATA AAA AAA CGG AGG TAT TTT ATG GAG GAA AAT ²⁹²AAT CAA AAT
 CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT CCT GAA GAA GTA
 CTT TTG GAT ³⁵²GGA GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT
 GAT ATT TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT
 GTA CCA GGG GGA GGA TTT TTA GTT ⁴¹²GCA TTA ATA GAT TTT GTA
 TGG GGA ATA GTT GGC CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA GTA
 CAA ⁴⁷²ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT
 AGG AAT GCT GCT ATT GCT AAT ⁵³²TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT
 TTC AAT ATA TAT GTG GAA GCA TTT AAA GAA TCG GAA GAA ⁵⁹²GAT
 CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CGC TTT
 CGT ATA CTT GAT GGG ⁶⁵²CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT
 CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA TCC ⁷¹²GTT TAT GCT
 CAA GCG GCC ⁷⁷²AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA
 ATT TTT GGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT
 GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT AGG CAT ⁸³²ATT GAT GAA TAT GCT
 GAT CAC TGT GCA AAT ACG TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA
 CCG ⁸⁹²AAA TCT ACG TAT CAA GAT TGG ATA ACA TAT AAT CGA TTA
 CGG AGA GAC TTA ACA TTG ⁹⁵²ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC
 TTT CCA AAC TAT GAC

Des séquences de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent l'enchaînement (I) défini ci-dessus.

D'une manière avantageuse, la séquence de nucléotides caractérisée par l'enchaînement défini ci-dessus code pour une partie d'un polypeptide ayant une activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis plus élevée que celle des polypeptides codés par des isolats naturels actuellement connus pour leurs effets vis-à-vis de S.littoralis.

L'étude de cette séquence de nucléotides montre qu'elle est caractérisée par un codon d'initiation ATG situé en position 241 à partir duquel une phase ouverte de lecture de 750 nucléotides a été identifiée.

Cette séquence est également caractérisée par un site d'attachement des ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

Selon un autre aspect, la séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comporte, en amont du codon ATG, une séquence allant du nucléotide en position 137 au nucléotide en position 177, fortement homologue à la région trouvée par Wong et al. (1983) et décrit dans (16) en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) et dont les auteurs ont montré qu'elle contenait trois promoteurs BtI, BtII et Ec qui sont respectivement fonctionnels chez B.thuringiensis et E.coli. L'homologie de ces séquences est d'environ 70%.

L'invention concerne également une séquence de nucléotides codant pour la séquence (II) d'acides aminés suivante :

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN
GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL
LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE
ASP ILE SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE
VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP
GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN
ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG
ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE
ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO
ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP PRG PHE ARG
ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG
ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR ALA GLN
ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE
PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU
ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP
HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO
LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG
ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE
PRO ASN TYR ASP

Une meilleure identification de la séquence de nucléotides isolée des souches ci-dessus, déposées à la CNCM a permis de constater que le nucléotide situé en position 273 est la guanine (G), l'acide aminé résultant du codon GTA étant alors la valine.

Or, la lecture du nucléotide correspondant à cette position 273 dans la demande FR.8708090 du 10 juin 1987 avait conduit à mentionner la thymine (T) et, comme acide aminé résultant du codon TTA, la leucine.

Une autre séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée par sa capacité d'hybridation avec une sonde formée à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :

15

20

25

30

35

1
 21
 31
 41
 51
 61
 71
 81
 91
 101
 111
 121
 131
 141
 151
 161
 171
 181
 191
 201
 211
 221
 231
 241
 251
 261
 271
 281
 291
 301
 311
 321
 331
 341
 351
 361
 371
 381
 391
 401
 411
 421
 431
 441
 451
 461
 471
 481
 491
 501
 511
 521
 531
 541
 551
 561
 571
 581
 591
 601
 611
 621
 631
 641
 651
 661
 671
 681
 691
 701
 711
 721
 731
 741
 751
 761
 771
 781
 791
 801
 811
 821
 831
 841
 851
 861
 871
 881
 891
 901
 911
 921
 931
 941
 951
 961
 971
 981
 991
 1001
 1011
 1021
 1031
 1041
 1051
 1061
 1071
 1081
 1091
 1101
 1111
 1121
 1131
 1141
 1151
 1161
 1171
 1181
 1191
 1201
 1211
 1221
 1231
 1241
 1251
 1261
 1271
 1281
 1291
 1301
 1311
 1321
 1331
 1341
 1351
 1361
 1371
 1381
 1391
 1401
 1411
 1421
 1431
 1441
 1451
 1461
 1471
 1481
 1491
 1501
 1511
 1521
 1531
 1541
 1551
 1561
 1571
 1581
 1591
 1601
 1611
 1621
 1631
 1641
 1651
 1661
 1671
 1681
 1691
 1701
 1711
 1721
 1731
 1741
 1751
 1761
 1771
 1781
 1791
 1801
 1811
 1821
 1831
 1841
 1851
 1861
 1871
 1881
 1891
 1901
 1911
 1921
 1931
 1941
 1951
 1961
 1971
 1981
 1991
 2001
 2011
 2021
 2031
 2041
 2051
 2061
 2071
 2081
 2091
 2101
 2111
 2121
 2131
 2141
 2151
 2161
 2171
 2181
 2191
 2201
 2211
 2221
 2231
 2241
 2251
 2261
 2271
 2281
 2291
 2301
 2311
 2321
 2331
 2341
 2351
 2361
 2371
 2381
 2391
 2401
 2411
 2421
 2431
 2441
 2451
 2461
 2471
 2481
 2491
 2501
 2511
 2521
 2531
 2541
 2551
 2561
 2571
 2581
 2591
 2601
 2611
 2621
 2631
 2641
 2651
 2661
 2671
 2681
 2691
 2701
 2711
 2721
 2731
 2741
 2751
 2761
 2771
 2781
 2791
 2801
 2811
 2821
 2831
 2841
 2851
 2861
 2871
 2881
 2891
 2901
 2911
 2921
 2931
 2941
 2951
 2961
 2971
 2981
 2991
 3001
 3011
 3021
 3031
 3041
 3051
 3061
 3071
 3081
 3091
 3101
 3111
 3121
 3131
 3141
 3151
 3161
 3171
 3181
 3191
 3201
 3211
 3221
 3231
 3241
 3251
 3261
 3271
 3281
 3291
 3301
 3311
 3321
 3331
 3341
 3351
 3361
 3371
 3381
 3391
 3401
 3411
 3421
 3431
 3441
 3451
 3461
 3471
 3481
 3491
 3501
 3511
 3521
 3531
 3541
 3551
 3561
 3571
 3581
 3591
 3601
 3611
 3621
 3631
 3641
 3651
 3661
 3671
 3681
 3691
 3701
 3711
 3721
 3731
 3741
 3751
 3761
 3771
 3781
 3791
 3801
 3811
 3821
 3831
 3841
 3851
 3861
 3871
 3881
 3891
 3901
 3911
 3921
 3931
 3941
 3951
 3961
 3971
 3981
 3991
 4001
 4011
 4021
 4031
 4041
 4051
 4061
 4071
 4081
 4091
 4101
 4111
 4121
 4131
 4141
 4151
 4161
 4171
 4181
 4191
 4201
 4211
 4221
 4231
 4241
 4251
 4261
 4271
 4281
 4291
 4301
 4311
 4321
 4331
 4341
 4351
 4361
 4371
 4381
 4391
 4401
 4411
 4421
 4431
 4441
 4451
 4461
 4471
 4481
 4491
 4501
 4511
 4521
 4531
 4541
 4551
 4561
 4571
 4581
 4591
 4601
 4611
 4621
 4631
 4641
 4651
 4661
 4671
 4681
 4691
 4701
 4711
 4721
 4731
 4741
 4751
 4761
 4771
 4781
 4791
 4801
 4811
 4821
 4831
 4841
 4851
 4861
 4871
 4881
 4891
 4901
 4911
 4921
 4931
 4941
 4951
 4961
 4971
 4981
 4991
 5001
 5011
 5021
 5031
 5041
 5051
 5061
 5071
 5081
 5091
 5101
 5111
 5121
 5131
 5141
 5151
 5161
 5171
 5181
 5191
 5201
 5211
 5221
 5231
 5241
 5251
 5261
 5271
 5281
 5291
 5301
 5311
 5321
 5331
 5341
 5351
 5361
 5371
 5381
 5391
 5401
 5411
 5421
 5431
 5441
 5451
 5461
 5471
 5481
 5491
 5501
 5511
 5521
 5531
 5541
 5551
 5561
 5571
 5581
 5591
 5601
 5611
 5621
 5631
 5641
 5651
 5661
 5671
 5681
 5691
 5701
 5711
 5721
 5731
 5741
 5751
 5761
 5771
 5781
 5791
 5801
 5811
 5821
 5831
 5841
 5851
 5861
 5871
 5881
 5891
 5901
 5911
 5921
 5931
 5941
 5951
 5961
 5971
 5981
 5991
 6001
 6011
 6021
 6031
 6041
 6051
 6061
 6071
 6081
 6091
 6101
 6111
 6121
 6131
 6141
 6151
 6161
 6171
 6181
 6191
 6201
 6211
 6221
 6231
 6241
 6251
 6261
 6271
 6281
 6291
 6301
 6311
 6321
 6331
 6341
 6351
 6361
 6371
 6381
 6391
 6401
 6411
 6421
 6431
 6441
 6451
 6461
 6471
 6481
 6491
 6501
 6511
 6521
 6531
 6541
 6551
 6561
 6571
 6581
 6591
 6601
 6611
 6621
 6631
 6641
 6651
 6661
 6671
 6681
 6691
 6701
 6711
 6721
 6731
 6741
 6751
 6761
 6771
 6781
 6791
 6801
 6811
 6821
 6831
 6841
 6851
 6861
 6871
 6881
 6891
 6901
 6911
 6921
 6931
 6941
 6951
 6961
 6971
 6981
 6991
 7001
 7011
 7021
 7031
 7041
 7051
 7061
 7071
 7081
 7091
 7101
 7111
 7121
 7131
 7141
 7151
 7161
 7171
 7181
 7191
 7201
 7211
 7221
 7231
 7241
 7251
 7261
 7271
 7281
 7291
 7301
 7311
 7321
 7331
 7341
 7351
 7361
 7371
 7381
 7391
 7401
 7411
 7421
 7431
 7441
 7451
 7461
 7471
 7481
 7491
 7501
 7511
 7521
 7531
 7541
 7551
 7561
 7571
 7581
 7591
 7601
 7611
 7621
 7631
 7641
 7651
 7661
 7671
 7681
 7691
 7701
 7711
 7721
 7731
 7741
 7751
 7761
 7771
 7781
 7791
 7801
 7811
 7821
 7831
 7841
 7851
 7861
 7871
 7881
 7891
 7901
 7911
 7921
 7931
 7941
 7951
 7961
 7971
 7981
 7991
 8001
 8011
 8021
 8031
 8041
 8051
 8061
 8071
 8081
 8091
 8101
 8111
 8121
 8131
 8141
 8151
 8161
 8171
 8181
 8191
 8201
 8211
 8221
 8231
 8241
 8251
 8261
 8271
 8281
 8291
 8301
 8311
 8321
 8331
 8341
 8351
 8361
 8371
 8381
 8391
 8401
 8411
 8421
 8431
 8441
 8451
 8461
 8471
 8481
 8491
 8501
 8511
 8521
 8531
 8541
 8551
 8561
 8571
 8581
 8591
 8601
 8611
 8621
 8631
 8641
 8651
 8661
 8671
 8681
 8691
 8701
 8711
 8721
 8731
 8741
 8751
 8761
 8771
 8781
 8791
 8801
 8811
 8821
 8831
 8841
 8851
 8861
 8871
 8881
 8891
 8901
 8911
 8921
 8931
 8941
 8951
 8961
 8971
 8981
 8991
 9001
 9011
 9021
 9031
 9041
 9051
 9061
 9071
 9081
 9091
 9101
 9111
 9121
 9131
 9141
 9151
 9161
 9171
 9181
 9191
 9201
 9211
 9221
 9231
 9241
 9251
 9261
 9271
 9281
 9291
 9301
 9311
 9321
 9331
 9341
 9351
 9361
 9371
 9381
 9391
 9401
 9411
 9421
 9431
 9441
 9451
 9461
 9471
 9481
 9491
 9501
 9511
 9521
 9531
 9541
 9551
 9561
 9571
 9581
 9591
 9601
 9611
 9621
 9631
 9641
 9651
 9661
 9671
 9681
 9691
 9701
 9711
 9721
 9731
 9741
 9751
 9761
 9771
 9781
 9791
 9801
 9811
 9821
 9831
 9841
 9851
 9861
 9871
 9881
 9891
 9901
 9911
 9921
 9931
 9941
 9951
 9961
 9971
 9981
 9991
 10001
 10011
 10021
 10031
 10041
 10051
 10061
 10071
 10081
 10091
 10101
 10111
 10121
 10131
 10141
 10151
 10161
 10171
 10181
 10191
 10201
 10211
 10221
 10231
 10241
 10251
 10261
 10271
 10281
 10291
 10301
 10311
 10321
 10331
 10341
 10351
 10361
 10371
 10381
 10391
 10401
 10411
 10421
 10431
 10441
 10451
 10461
 10471
 10481
 10491
 10501
 10511
 10521
 10531
 10541
 10551
 10561
 10571
 10581
 10591
 10601
 10611
 10621
 10631
 10641
 10651
 10661
 10671
 10681
 10691
 10701
 10711
 10721
 10731
 10741
 10751
 10761
 10771
 10781
 10791
 10801
 10811
 10821
 10831
 10841
 10851
 10861
 10871
 10881
 10891
 10901
 10911
 10921
 10931
 10941
 10951
 10961
 10971
 10981
 10991
 11001
 11011
 11021
 11031
 11041
 11051
 11061
 11071
 11081
 11091
 11101
 11111
 11121
 11131
 11141
 11151
 11161
 11171
 11181
 11191
 11201
 11211
 11221
 11231
 11241
 11251
 11261
 11271
 11281
 11291
 11301
 11311
 11321
 11331
 11341
 11351
 11361
 11371
 11381
 11391
 11401
 11411
 11421
 11431
 11441
 11451
 11461
 11471
 11481
 11491
 11501
 11511
 11521
 11531
 11541
 11551
 11561
 11571
 11581
 11591
 11601
 11611
 11621
 11631
 11641
 11651
 11661
 11671
 11681
 11691
 11701
 11711
 11721
 11731
 11741
 11751
 11761
 11771
 11781
 11791
 11801
 11811
 11821
 11831
 11841
 11851
 11861
 11871
 11881
 11891
 11901
 11911
 11921
 11931
 11941
 11951
 11961
 11971
 11981
 11991
 12001
 12011
 12021
 12031
 12041
 12051
 12061
 12071
 12081
 12091
 12101
 12111
 12121
 12131
 12141
 12151
 12161
 12171
 12181
 12191
 12201
 12211
 12221
 12231
 12241
 12251
 12261
 12271
 12281
 12291
 12301
 12311
 12321
 12331
 12341
 12351
 12361
 12371
 12381
 12391
 12401
 12411
 12421
 12431
 12441
 12451
 12461
 12471
 12481
 12491
 12501
 12511
 12521
 12531
 12541
 12551
 12561
 12571
 12581
 12591
 12601
 12611
 12621
 12631
 12641
 12651
 12661
 12671
 12681
 12691
 12701
 12711
 12721
 12731
 12741
 12751
 12761
 12771
 12781
 12791
 12801
 12811
 12821
 12831
 12841
 12851
 12861
 12871
 12881
 12891
 12901
 12911
 12921
 12931
 12941
 12951
 12961
 12971
 12981
 12991
 13001
 13011
 13021
 13031
 13041
 13051
 13061
 13071
 13081
 13091
 13101
 13111
 13121
 13131
 13141
 13151
 13161
 13171
 13181
 13191
 13201
 13211
 13221
 13231
 13241
 13251
 13261
 13271
 13281
 13291
 13301
 13311
 13321
 13331

De façon particulière, des séquences de nucléotides de l'invention codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis comprennent ou sont constituées par l'enchaînement (III) défini précédemment.

L'enchaînement (III), compris dans la séquence de nucléotides de l'invention, contient 2711 nucléotides. Ce fragment comprend notamment le promoteur potentiel du gène de la δ -endotoxine active sur S.littoralis.

Entrent naturellement dans le cadre de la présente invention, des séquences de nucléotides modifiées par rapport aux enchaînements (I) ou (III) décrits ci-dessus, dans la mesure où ces modifications ne génèrent pas des variations sensibles de la toxicité du polypeptide codé par la séquence modifiée, vis-à-vis de S.littoralis.

Ces modifications peuvent par exemple consister en des délétions, substitutions, recombinaisons.

Ainsi les séquences de nucléotides (I) et (III) comportent en leur position 611 un nucléotide variable correspondant à l'adénine (A) dans la séquence (I) et à la cytosine (C) dans la séquence (III). Ces nucléotides entrent dans la composition des codons respectifs GAA et GCA qui codent respectivement pour les acides aminés acide glutamique (GLU) et alanine (ALA) dans les séquences respectives II et IV.

De même toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements (I) ou (III), telle qu'obtenue par transformation enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique entre également dans le cadre des définitions de l'invention.

La séquence de nucléotides de formule (III) commence par un codon d'initiation ATG situé en position 241 et qui représente le début d'une phase ouverte de

13

lecture de 2470 nucléotides.

L'invention concerne en outre une séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV) d'acides aminés

5 ci-après :

10

15

20

25

30

35

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE

271 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE SER LEU SER

361 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER

451 GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU

541 GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE

631 ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR

721 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU

811 CYS TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER

901 THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ASP LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

931

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER
 1081 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE
 1171 THR ASP TR PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR IMP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY GLY ASN ILE THR SER PRO
 1261 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG
 1331 LEU LEU LN GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL GLU PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR
 1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS
 1521 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL VAL PHE SER TAP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN
 1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TAP GLY GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE
 1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG
 1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

1191 ASN MET PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR THR ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE
 1201 ARG ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN
 2161 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP
 2231 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 2611 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP
 2701 CYS SER CYS

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage comportant plus particulièrement au moins une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, en particulier au moins une
5 partie de la séquence d'environ 3kb.

Un vecteur recombinant particulier est par exemple un plasmide comprenant le fragment HindIII-PstI de la séquence de nucléotides de l'invention, inséré dans un vecteur pUC9. Un premier vecteur préféré est le plasmide pHT71 dont la construction est rapportée dans les
10 ensembles ci-après, qui comprend un fragment d'ADN HindIII-PstI selon l'invention constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

Un autre vecteur recombinant est constitué par le plasmide pHT 671 dont la construction est donnée dans
15 la figure 4. Ce plasmide comprend un fragment HindIII-PstI chimère, obtenu en fusionnant un fragment d'ADN HindIII-HindII de 1,1 kb provenant de la souche entomocidus 6-01 avec un fragment HincII-PstI de 1,9 kb issu de la souche aizawai 7-29.
20

Entrent également dans le cadre de l'invention les souches bactériennes modifiées qui comportent l'une des séquences nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant d'expression et de clonage défini
25 précédemment, de préférence le plasmide pHT 671 ou le plasmide pHT71.

L'invention vise en outre un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, s'attaquant aux
30 feuilles de coton ou des autres cultures telles qu'énumérées ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

35 L'invention vise plus particulièrement la

partie NH_2 -terminale de ce polypeptide qui renferme l'activité larvicide.

L'extrémité de la partie NH_2 -terminale active répond à la séquence (II) d'acides aminés donnée ci-dessus.

Un polypeptide préféré de l'invention est celui qui répond à cette séquence (II) et répond à la séquence (IV) d'acides aminés donnée dans les pages précédentes. Ce polypeptide répondant à la séquence (IV) comprend 823 acides aminés. Sa masse moléculaire calculée est de 92906 Da.

Cette séquence de δ -endotoxine a été comparée aux séquences en acides aminés des δ -endotoxines provenant d'autres souches de B.thuringiensis actives sur les lépidoptères et dont les gènes ont été isolés et séquencés précédemment : il s'agit des δ -endotoxines des souches kurstaki HD1 (19), kurstaki HD73 (20), berliner 1715 (21) et (22) Sotto (23) et aizawai IPL7 (24).

Les résultats de ces comparaisons indiquent que toutes sont différentes dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620) alors que la partie NH_2 terminale (acides aminés 1 à 280) et le domaine COOH terminal (acides aminés 621 à 1175) de la protéine sont très conservés et ne diffèrent que par quelques acides aminés. En revanche la δ -endotoxine correspondant à la séquence (IV) ci-dessus présente des différences importantes avec les autres δ -endotoxines, aussi bien dans la partie NH_2 terminale (acides aminés 1 à 280) que dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620). Les résultats de ces comparaisons indiquent encore que la moitié NH_2 -terminale de la molécule (acides aminés 1 à 620) qui correspond à la fraction toxique de la protéine ne présente que 46% d'homologie avec les autres δ -endotoxines. Les différences les plus importantes se situent dans la seconde moitié de la partie toxique de la

molécule (acides aminés 281 à 620) avec seulement 36% d'acides aminés identiques, la partie NH₂-terminale (acides aminés 1 à 280) présentant quant à elle 58% d'acides aminés identiques avec les autres δ -endotoxines. De telles différences importantes n'ont jamais été observées jusqu'à présent dans la partie NH₂-terminale de la fraction toxique de la molécule, parmi les δ -endotoxines actives sur les lépidoptères.

Pour obtenir une séquence de nucléotides entrant dans le cadre de l'invention, codant pour au moins la partie active d'un polypeptide présentant une toxicité spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, on a recours, conformément à l'invention, aux étapes suivantes, à savoir :

- la réalisation d'une hybridation moléculaire entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis active contre S.littoralis, et d'autre part au moins deux séquences de nucléotides, utilisées comme sondes, provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène de δ -endotoxine de B.thuringiensis, cette partie codant pour la partie NH₂-terminale du polypeptide actif sur les larves de lépidoptères et de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du polypeptide,
- l'isolement du fragment hybridé,
- son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

De manière avantageuse, les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène de δ -endotoxine provenant de la souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de 130 kDa, active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

Dans un mode de réalisation du procédé précédent, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de

20

clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant d'une unique souche de B.thuringiensis, de préférence aizawai 7.29. En particulier ce fragment est porté préférentiellement par le
5 plasmide recombinant pHTA6 tel qu'isolé à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences
10 nucléotides issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de
15 clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins deux souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou
20 partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif, de manière préférentielle, vis-à-vis de S.littoralis.

Dans ce cas, le fragment recombiné utilisé dans l'étape de clonage est un fragment de 3kb environ,
25 élaboré avantageusement à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII d'environ 1,1kb provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment HincII-PstI d'environ 1,9kb de la souche aizawai 7.29. Il correspond à un gène tronqué de δ -endotoxine.

30 Les fragments de restriction HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés plus spécialement par les plasmides recombinants respectifs pHTA6 et pHTA6 tels qu'isolés à l'aide de la sonde constituée par le fragment PvuII dont question ci-dessus.

35 L'étude de la toxicité, vis-à-vis des larves de

lépidoptères, des souches bactériennes modifiées à l'aide des séquences de nucléotides définies ci-dessus, a permis de mettre en évidence leur activité toxique élevée, notamment à l'égard des chenilles de S.littoralis.

5 Cette activité a été appréciée au regard de l'indice de spécificité correspondant au rapport
 CL50 S.littoralis

 CL50 P.brassicae

10 dans lequel "CL50" représente la concentration létale tuant 50% des larves en 72 heures.

 L'utilisation d'un tel indice permet d'évaluer l'activité des souches bactériennes étudiées sans avoir à considérer le taux d'expression des polypeptides.

15 Les résultats obtenus, qui sont rapportés dans les exemples qui suivent, et les valeurs de DL 50 qui en sont déduites, ont montré que les souches bactériennes modifiées selon l'invention présentent une activité toxique vis-à-vis de S.littoralis plus spécifique que les
20 protéines de cristal natives des souches azawai 7-29 ou berliner 1715.

 L'invention vise donc l'application, pour l'élaboration de compositions larvicides toxiques de préférence vis-à-vis de S.littoralis, de ces souches
25 modifiées, de vecteurs recombinants renfermant les séquences nucléotidiques définies plus haut, en particulier du plasmide pHT671 et du plasmide pHT71, et de ces séquences elles-mêmes.

 Les compositions larvicides de l'invention sont
30 alors caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace de polypeptides tels que définis ci-dessus ou exprimés par les séquences nucléotidiques évoquées plus haut.

 Pour produire ces polypeptides on met avanta-
35 geusement en oeuvre les gènes tronqués de δ -endotoxine

correspondant aux séquences nucléotidiques de l'invention.

Ces gènes peuvent être utilisés pour produire en excès le polypeptide toxique dans des microorganismes permettant l'expression des vecteurs recombinants ci-dessus. Des souches de microorganismes appropriées comprennent E.coli ou encore B.subtilis.

Ces gènes tronqués peuvent être réintroduits dans les souches de B.thuringiensis ou dans des espèces apparentées telle que B.cereus, selon les techniques classiques, par exemple, par transformation, conjugaison ou transduction. Ces techniques permettent de produire le polypeptide toxique en grande quantité sans avoir à modifier au préalable la région naturelle du promoteur des gènes de δ -endotoxine de B.thuringiensis.

Cette transformation peut être effectuée en utilisant des méthodes dérivées de la transformation des protoplastes de B.subtilis selon (11) ou des cellules végétatives de B.thuringiensis comme décrit dans (12).

L'introduction de plasmides recombinants par un système de type conjugaison, peut être réalisée en utilisant B.thuringiensis comme souche hôte et B.subtilis ou Streptococcus faecalis comme souches de type donneur, en opérant selon (13) et (14).

En variante, les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences. L'introduction peut être effectuée dans des microorganismes tels que Pseudomonas en opérant selon le procédé décrit dans (17), par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques contenant le transposon Tn5 et le gène de la toxine, ou Azospirillum ou Rhizobium par l'intermédiaire de vecteurs suicides dérivés du plasmide RP4 et de plasmides mobilisateurs fonctionnels chez les

bactéries gram négatives (pRK2013 par exemple) selon les procédés décrits dans (18).

Les gènes tronqués sont seuls dans les souches de Bacilli, ou en variante sont associés à différents gènes de δ -endotoxine ce qui permet d'obtenir des cristaux synthétisés par ces souches spécifiquement toxiques, vis-à-vis d'espèces données de Noctuelles, ou toxiques à la fois vis-à-vis des Noctuelles et d'insectes sensibles aux autres δ -endotoxines. Ces recombinaisons, effectuées in vitro ou in vivo avec les séquences nucléotidiques de l'invention et d'autres gènes de δ -endotoxines présentant des spécificités toxiques différentes, conduisent à la construction de nouveaux gènes codant pour de nouvelles protéines toxiques hybrides présentant un large spectre d'activité vis-à-vis des insectes. Ces nouveaux gènes et ces nouvelles protéines entrent également dans le cadre de l'invention.

Dans ces applications, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être transférées et exprimées dans des plantes sensibles à S.littoralis afin de diminuer les ravages causés par ces insectes.

Parmi les plantes à protéger, on citera : le coton, le trèfle, la tomate et la luzerne.

Le transfert du gène tronqué dans des plants de coton, peut être réalisé par transformation mettant en jeu des souches telles que Agrobacterium comme décrit dans (15).

L'invention concerne en outre les cellules végétales, les plantes et les graines renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Les cellules végétales selon l'invention sont des cellules dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que

définie ci-dessus. L'invention concerne également les cellules végétales issues de leur division.

Les plantes selon l'invention sont des plantes transformées par un procédé non essentiellement biologique, ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis. Il s'agit aussi de plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication ou de croisements hybrides.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans leur génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

L'invention vise en outre des graines capables de donner une plante telle que définie ci-dessus ou issues d'une telle plante, caractérisées en ce qu'elles ont intégré dans leur génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotide décrite plus haut.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description et en se reportant aux exemples dans lesquels :

- la figure 1 représente la carte de restriction des plasmides pHTA6 et pHTE6,
- la figure 2, la carte de restriction d'un gène d'une protéine de cristal de la souche aizawai 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2 et définissant les fragments d'ADN qui sont utilisés comme sonde,
- la figure 3, présente le fragment de 6,6kb cloné dans

pHTA6 et le résultat d'une hybridation effectuée entre ce fragment et les sondes décrites dans la figure 2,

- la figure 4, la carte de restriction du plasmide pHT671, et

5 - la figure 5, les photographies de tests d'immunodiffusion.

Les expériences d'hybridation réalisées pour la mise en oeuvre de l'invention ont été effectuées à 42°C pendant 24 h. dans une solution contenant 5 x SSC, 30% de
10 formamide et 1 Denhardt (7) en présence de la sonde ADN marquée au ³²P. Les filtres sont lavés à 42°C, 20 mn, en utilisant successivement les solutions suivantes :
5 x SSC dans 30% de formamide, 5 x SSC, 2 x SSC, 1 x SSC et 0,5 x SSC avant séchage à température ambiante.

15 EXEMPLE I - Construction d'une séquence d'ADN de 3kb environ contenant un gène chimère d'une toxine insecticide

Cette construction comprend :

20 1/ la préparation de banques de gènes de B. thuringiensis
2/ la sélection et la caractérisation des clones transformants renfermant les gènes d'une protéine du cristal et des séquences nucléotidiques responsables de l'activité larvicide,

25 3/ recombinaison in vitro de ces séquences dans un vecteur de clonage avec construction du plasmide pHT671.

Ces différentes étapes sont réalisées comme suit :

1/ Préparation de banques de gènes de B. thuringiensis.

30 L'ADN total des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01 de Bacillus thuringiensis est purifié en utilisant la méthode rapportée dans (1) et 50µg de chaque ADN purifié sont complètement digérés avec l'enzyme de restriction PstI.

26

L'ADN digéré par PstI est analysé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et des fragments d'ADN d'une taille de 5 à 8 kb sont récupérés à partir des gels d'agarose, par électroélution, de la manière décrite dans (2).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la souche aizawai 7-29 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC18 digéré par PstI selon (3).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la chaîne entomocidus 6-01 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC9 digéré par PstI. Les cellules de E.coli JM83 sont transformées avec le mélange de ligature comme décrit dans (4).

Les clones transformants de E.coli sont sélectionnés sur milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

2/ Isolement et caractérisation des clones transformants contenant les gènes d'une protéine de cristal.

A/ Criblage des cellules de E.coli transformées à l'aide d'un fragment interne d'un gène de la protéine du cristal marqué au ³²P, utilisé comme sonde :

Des clones transformants contenant des plasmides recombinants portant le gène du cristal sont détectés par hybridation sur colonies, suivant la méthode décrite dans (5), en utilisant comme sonde un fragment PvuII de 2 kb du plasmide pBT 15-88 correspondant à une partie interne du gène de la protéine du cristal, situé sur le chromosome de la souche berliner 1715.

B/ Caractérisation des plasmides recombinants présents dans les clones qui réagissent avec la sonde ci-dessus.

Deux plasmides recombinants, pHTA6 et pHTE6, isolés respectivement des banques de gènes construites à

partir des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, présentent une homologie avec cette sonde. Dans chaque cas, un fragment d'ADN d'environ 6,6 kb a été cloné.

La carte de restriction des deux plasmides est donnée sur la figure 1. La comparaison des sites de restriction montre que les deux fragments d'ADN clonés semblent identiques.

Afin de délimiter les séquences correspondant au gène de la δ -endotoxine, différents fragments d'ADN marqués au ^{32}P , provenant d'un gène du cristal précédemment caractérisé, et cloné dans le plasmide recombinant pHTA2, sont utilisés comme sondes. Ce dernier gène du cristal également originaire de la souche aizawai 7-29 code pour une protéine de 130 kd active contre P. bras-
sicae mais pas contre S. littoralis. Ce type de gène possède la même carte de restriction que le gène de la δ -endotoxine issu de la souche berliner 1715. Sur la figure 2, on a rapporté la carte de restriction de ce gène de la protéine du cristal de la souche de aizawai 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2. Les traits épais indiqués au-dessus de la carte correspondent aux fragments utilisés comme sondes d'hybridation.

Les plasmides pHTA6 et pHTE6 sont hydrolysés par différentes endonucléases de restriction, analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et hybridés avec les différentes sondes.

Le transfert de l'ADN sur des filtres de nitrocellulose est réalisé suivant la méthode de SOUTHERN décrite dans (6). L'hybridation est conduite à 42°C pendant 24 heures dans une solution contenant : 5X SSC, 30% de formamide et un mélange 1X Denhardt décrit dans (7) en présence d'une sonde d'ADN marquée au ^{32}P . Les filtres sont ensuite lavés à 42°C pendant 20 minutes, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 SSC dans 50% de formamide, 5 SSC, 2 SSC, 1 SSC et 0,5 SSC

avant d'être séchés à la température ambiante.

Les résultats de ces expériences d'hybridation sont résumés sur la figure 3. Il apparaît que chaque extrémité des fragments d'ADN de 6,6 kb clonés présente une homologie avec les sondes. Le fragment PstI-KpnI de 1,5 kb réagissant avec la sonde n° 3 correspond à l'extrémité 3' d'un gène de la protéine du cristal présent à la fois dans les souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01. Comme il est indiqué sur la figure 3, les sondes n° 1 et n° 2 correspondant à l'extrémité 5' du gène de la δ -endotoxine de pHTA2, s'hybrident avec le fragment HindIII-HincII de 1,1 kb contenu dans le plasmide pHTA6. La sonde n°3 qui couvre l'extrémité 3' du gène de la δ -endotoxine de pHTA2, s'hybride avec le fragment HindIII-PstI de 0,4kb contenu dans le plasmide pHTA6. Il doit être noté qu'un faible signal d'hybridation est obtenu avec la sonde n° 2 alors que les deux autres sondes donnent des signaux facilement détectables.

A partir de ces résultats, les inventeurs ont établi que le fragment d'ADN HindIII-PstI de 3 kb correspond à une grande partie d'un gène de la δ -endotoxine qui commence près du site HindIII central. Il apparaît clairement au vu des résultats des expériences d'hybridation que le gène de la δ -endotoxine présente des différences substantielles avec ceux caractérisés dans l'art antérieur. Sur la base de ces résultats il a été décidé de cloner le fragment de 3 kb HindIII-PstI dans le vecteur pUC9.

3/ Construction du plasmide pHT 671 contenant un gène chimère de la toxine insecticide reconstitué.

Le fragment d'ADN HindIII-HincII de 1,1 kb issu du plasmide pHTA6 et le fragment d'ADN HincII-PstI de 1,9kb issu du plasmide pHTA6 sont purifiés sur gels d'agarose.

Des quantités égales des deux fragments d'ADN purifiés et de l'ADN de pUC9 digéré avec HindIII et PstI sont mélangées et ligaturées. Le mélange de ligature est utilisé pour transformer des cellules compétentes de E.coli JM83, puis les cellules transformées de E.coli sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline. L'un des clones recombinants intéressant examiné contient un plasmide désigné par pHT671, dont la carte de restriction a été déterminée et est représentée sur la figure 4. Ce plasmide (pHT671) contient un fragment d'ADN de 3 kb inséré dans le vecteur pUC9. Cette séquence d'ADN a la même carte de restriction que les fragments HindIII-PstI de 3 kb contenus dans les plasmides pHTA6 et pHTE6, mais correspond à une molécule d'ADN reconstituée construite par recombinaison in vitro à partir de séquences d'ADN provenant des souches aizawai 7-29 d'une part et entomocidus 6-01 d'autre part.

EXEMPLE II : Etude de la séquence nucléotidique de la région du promoteur et de la région codant pour la partie NH₂ terminale de la δ -endotoxine active contre les Noctuidae.

Le fragment HindIII-HincII de pHT671 est séquencé conformément à la méthode décrite dans (8) en utilisant un système M13. Pour obtenir des fragments d'ADN clonés se chevauchant partiellement qui seront utilisés dans le séquençage de l'ADN, on a recours à la méthode de sous-clonage par délétion dans M13, développée par DALE et al (9).

La séquence de 940 nucléotides du fragment HindIII-HincII qui est d'une longueur d'environ 1 kilobase correspond à l'enchaînement I ci-dessus.

L'analyse de cette séquence montre que la plus grande phase ouverte de lecture commence à la position 244 et qu'un site potentiel de liaison aux ribosomes GGAGG se trouve six paires de base en amont de ce codon

ATG (position 230 à 235). La région localisée entre les nucléotides 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon ATG) est fortement homologue à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) séquencée par WONG et al (1983) et décrite dans (16) et dont les auteurs ont montré qu'elle contient trois promoteurs BtI, BtII, et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E.coli respectivement. La comparaison entre les séquences en acides aminés déduites des 750 premiers nucléotides des gènes de BTK et pHT671, montre que ces polypeptides présentent des différences significatives au niveau de la moitié N-terminale de la partie active issue de la protoxine (seulement 66% d'homologie stricte). Il est important de noter que c'est la première fois qu'un gène de la δ -endotoxine isolé à partir d'une souche active contre les lépidoptères code pour un polypeptide qui présente des différences substantielles dans cette région. En effet, ce domaine N-terminal apparaît fortement conservé (plus de 97% d'homologie stricte) parmi tous les gènes du cristal actifs sur lépidoptères qui ont été séquencés jusqu'à présent. Par ailleurs, les inventeurs ont montré que le taux de variabilité est du même ordre si l'on considère les séquences nucléotidiques de pHT671 et des autres gènes de type lépidoptères.

EXEMPLE III : Construction d'une séquence d'ADN de 2,7kb environ contenant un gène d'une toxine larvicide.

Pour réaliser cette construction on a utilisé l'ADN de la souche aizawai 7.29 de B.thuringiensis jusqu'à l'étape de réalisation du plasmide pHTA6 telle que décrite dans l'exemple I.

Le fragment HindIII-PstI d'environ 2,7kb obtenu à partir du plasmide pHTA6 a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pUC9, préalablement hydrolysé par les enzymes de restriction HindIII-PstI, pour donner le plasmide pHT71.

EXEMPLE IV : Etude de la séquence de nucléotides constituant le plasmide pHT71 codant pour un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles.

5 Le fragment HindIII-Pst-I de 2,7kb de pHTA6, qui a été sous-cloné dans pHT71, a été séquencé par la technique de Sanger et al.(8) en utilisant le phage M13mp19 et le système de sous-clonage par délétions développé par Dale et al.(9). Ce système permet d'obtenir
10 des phages M13 contenant une série de fragments d'ADN se chevauchant partiellement et qui peuvent être utilisés pour le séquençage de l'ADN.

La séquence de nucléotides de ce fragment de 2,7kb qui correspond à l'enchaînement (III) donné ci-dessus, a été déterminée sur les 2 brins d'ADN, exception
15 faite des 212 derniers nucléotides (position 2500 à 2711) qui n'ont été séquencés que sur 1 seul brin.

La séquence nucléotidique de ce fragment Hind-III-PstI a une longueur de 2711 nucléotides. Ce
20 fragment contient le promoteur potentiel ainsi que la plus grande partie du gène de la δ -endotoxine active sur S.littoralis.

EXEMPLE V : Etude de la toxicité spécifique des clones recombinants de E.coli JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) contre S.littoralis.

25

La toxicité des clones recombinants de E.coli JM83 contenant pHT671 et de E.coli JM83 contenant pHT71 a été déterminée par des tests biologiques sur des chenilles de l'espèce P.brassicae et S.littoralis comme décrit par LECADET et MARTOURET dans (10). Les résultats ont été comparés avec la toxicité spécifique des protéines de cristal natives et purifiées à partir des souches berliner 1715 et aizawai 7-29 entomocidus 6.01 B cereus 569 (contenant le plasmide pBT45, pAM β 1) contre
35 les deux espèces d'insectes. La toxicité spécifique du clone recombinant et des souches de B.thuringiensis est

exprimée en termes d'"indice de spécificité" défini précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 1 ci-après.

5 Dans ce tableau, pour des souches de E.coli, la concentration 1 correspond à une culture bactérienne de 14 heures concentrée 20 fois, désintégrée par ultrasons ; pour les souches de B.thuringiensis la concentration est exprimée en µg de protéine cristal par µl de préparation.

10 L'activité toxique des préparations a été testée par ingestion forcée sur des chenilles au cinquième stade de développement avec 5 µl de préparation, ou par une technique d'ingestion libre en utilisant des larves au deuxième stade de développement.

15

20

25

30

35

33

TABLEAU 1

Toxicité comparée d'un clone recombinant et de deux souches de B.thuringiensis vis-à-vis de S.littoralis et P.brassicae.

5	Souches et plasmides	S.littoralis		P.brassicae	Indice de spécificité CL50 <u>S.littoralis</u> CL50 <u>P.brassicae</u>
		CL50 2ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	
10	JM83 (pUC18)	> 1	> 1	> 1	-
	JM83 (pHT671)	0,04	0,13	0,72	0,2
	JM83 (pHTA2)	> 1	> 1	0,03	> 30
15	JM83 (pHTA4)	> 1	> 1	> 1	-
	JM83 (pHT71)	ND	0.5	> 1	< 0.5
	<u>berliner 1715</u> cristaux natifs	ND	0.11	0.007	15,7
20	<u>aizawai 7.29</u> cristaux natifs	ND	0.02	0.04	0.5
	<u>entomocidus 601</u> cristaux natifs	ND	0.028	0.012	2.3
25	<u>B.cereus 569</u> (pBT45,pAM β 1)	ND	0,38	0,054	7

3C

35

L'examen des valeurs de CL50 résumées dans ce tableau 1 montre que les extraits de protéine des clones recombinants JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont préférentiellement toxiques contre S.littoralis. En second lieu une comparaison des valeurs de l'indice de spécificité montre que l'activité larvicide des clones recombinants est plus spécifique à raison de 2,5 fois envers S.littoralis que les protéines du cristal natives de la souche aizawai. Par ailleurs, les clones recombinants de JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont très actifs contre un autre insecte de la famille des Noctuidae, Mamestra brassicae (pour le clone JM83 (pHT671) par exemple, la valeur CL50 est de 0,02, en utilisant des larves du deuxième stade de développement).

Ces deux résultats montrent que le gène de la toxine larvicide construit et cloné dans les plasmides pHT671 et pHT71 code pour une protéine spécifiquement active contre S.littoralis.

D'autres préparations obtenues à partir de clones recombinants contenant des plasmides portant des gènes codant pour d'autres types de δ -endotoxines (pHTA2 et pHTA4) ne sont pas actives sur S.littoralis : on peut voir que le plasmide pHTA2 code pour une δ -endotoxine spécifiquement active sur P.brassicae alors que le plasmide pHTA4 code pour une δ -endotoxine dont l'insecte cible n'a pas encore été identifié. On peut également voir que les inclusions cristallines produites par une souche de Bacillus cereus qui a reçu le plasmide pBT45, un des plasmides de la souche aizawai 7-29 qui porte aussi un gène de δ -endotoxine (le gène d'origine plasmidique de la souche aizawai 7-29), sont également spécifiquement actives sur P.brassicae.

Des résultats similaires sont obtenus en utilisant, à la place des extraits bactériens bruts, des extraits protéiques solubles préparés à partir de

différents clones recombinants de E.coli.

Sur la base des valeurs de la CL50 rapportées dans le tableau ci-dessus et d'un poids individuel moyen de 41 mg par larve L5 (cinquième stade larvaire) de S.littoralis, la valeur de la DL50 a été estimée à 2,4 µg/gramme de larve pour les cristaux natifs de la souche aizawai 7-29.

Sur ces mêmes bases et sur la base de facteurs d'équivalence permettant de passer de la masse bactérienne totale à la quantité de protéines spécifiques (2% environ des protéines totales chez E.coli JM83 (pHT671), la DL50 correspondant à la toxine produite par l'expression chez E.coli JM83 du gène selon l'invention cloné dans le plasmide pHT671, a été déterminée et estimée à une valeur proche de 5,5 à 6 µg/gramme de larve.

Sur ces mêmes bases et après détermination de la CL50 d'extraits protéiques solubles préparés à partir de cultures broyées de E.coli JM83 (pHT671), la valeur de la DL50 correspondant à la toxine présente dans ces extraits a été estimée à 4,15 µg/gramme de larve.

Dans les deux cas et particulièrement dans le cas des broyats de E.coli, les valeurs de DL50 calculées sont approximatives et supérieures à celle des cristaux natifs, puisqu'il ne s'agit pas de toxine purifiée. Cependant ces données indiquent sans ambiguïté que le gène exprimé par pHT671 détermine une δ-endotoxine présentant la spécificité vis-à-vis de S.littoralis. En effet, le même type d'estimation réalisé avec des extraits de E.coli JM83 (pHTA2) portant un gène de δ-endotoxine de spécificité différente conduit à des valeurs 30 à 50 fois supérieures de la DL50 des extraits solubles, vis-à-vis de S.littoralis (135 à 350 µg/gramme de larve).

Les données qui précèdent permettront aisément à l'homme de l'art d'élaborer des compositions larvicides

36

actives avec les protéines de l'invention.

D'autres expériences de toxicité ont été réalisées en utilisant des larves au deuxième stade larvaire de M.brassicae, S.frugiperda et S.littoralis.

5 Les résultats obtenus, exprimés en termes de LC 50 comme défini pour le tableau 1, sont donnés dans le tableau 2.

10

15

20

25

30

35

TABLEAU 2
 ACTIVITE DES CLONES RECOMBINANTS
 CONTRE LES LARVES D'INSECTES
 DE LA FAMILLE DES NOCTUIDAE
M. BRASSICAE, S. FRUGIPERDA AND S. LITTORALIS

SOUCHES ET PLASMIDES	LARVE D'INSECTE ET STADE	<u>M. BRASSICAE</u>	<u>S. FRUGIPERDA</u>	<u>S. LITTORALIS</u>
		CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE
JM 83 (pUC18)		NT	NT	NT
JM 83 (pHTA2)		> 1	0,51	0,9
JM 83 (pHT671)		0,02	0,5	0,03
JM 83 (pHT71)		ND	ND	0,03
JM 83 (pHTA4)		> 1	0,54	> 1

Il ressort de l'examen du tableau 2 que les extraits bactériens bruts du clone recombinant JM83 (pHT671) sont toxiques vis-à-vis de M.brassicae et de S.littoralis (les valeurs de CL50 sont respectivement de 0,02 et 0,03) et faiblement toxiques vis-à-vis de S.fruqiperda (CL50 de 0,5).

Les extraits du clone recombinant E.coli JM83 (pHTA2) sont faiblement actifs à l'égard de S.fruqiperda et de S.littoralis et pas du tout toxique à l'égard de M.brassicae. Les extraits du clone recombinant JM83 (pHTA4) ne sont pas toxiques vis-à-vis de M.brassicae et de S.littoralis et sont faiblement toxiques à l'égard de S.fruqiperda.

Ces résultats confirment la forte toxicité spécifique des protéines obtenues à partir de pHT71 et de pHT671 à l'égard de S.littoralis et montrent que cette classe de protéine de cristal est aussi très active à l'égard de M.brassicae.

EXEMPLE VI : Etude de la spécificité des polypeptides exprimés par les clones formés par introduction des plasmides pHT671 et pHT71 dans E.coli.

Cette étude a été réalisée grâce à des tests d'immuno-diffusion. Les résultats sont rapportés sur la figure 5 (qui comprend les figures 5A et 5B).

La mise en oeuvre de l'expérience d'immuno-diffusion a été réalisée conformément au protocole suivant :

Des extraits solubles de protéines de clones E.coli contenant les plasmides pHT671, pHTA4, pHTA2 ou pHT71, pUC18 ont été placés respectivement dans les puits n° 2, 3, 4, 5, 6. Un échantillon d'un cristal purifié solubilisé de aizawai 7.29 a été placé dans le puits n° 1 afin de servir de contrôle positif.

Dans le test rapporté sur la figure 5A un

antisérum contre toutes les δ -endotoxines de aizawai 7.29, contenant des anticorps de lapin dirigés contre les protéines du cristal solubilisées a été utilisé et placé dans le puits central.

5 Une ligne d'immunoprécipitation a été observée dans tous les cas excepté dans le cas de l'extrait de E.coli contenant le vecteur plasmidique seul (puits n° 6).

10 On a remarqué que les lignes d'immunoprécipitation issues des puits n° 4 et n° 5 croisent, ce qui montre que les produits codés par les plasmides pHTA2 et pHT71 respectivement présentent des déterminants antigéniques différents.

15 Dans le test rapporté sur la figure 5B, l'antisérum utilisé contenait des anticorps polyclonaux de lapin contre les protéines du cristal de berliner 1715.

20 Une ligne d'immunoprécipitation a été observée avec les extraits de E.coli JM83 (pHTA4) (puits n° 3) JM83 (pHTA2) (puits n° 4). En revanche les clones E.coli JM83 (pHT71) (puits n° 5) JM83 (pHT671) (puits n° 2) ou JM83 (pUC9) (puits n° 6) ne donnent pas d'immunoprécipitation.

25 On peut en déduire que les gènes du cristal isolés dans pHTA4 et pHTA2 expriment des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de berliner 1715, souche qui n'est pas spécifiquement active vis-à-vis de S.littoralis.

30 En revanche, les extraits bruts de E.coli contenant les plasmides pHT671 et pHT71 contiennent des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de la souche aizawai 7.29, qui ne sont pas liés sur le plan immunogène avec les protéines du cristal de la souche berliner 1715.

35 Ces résultats confirment ceux donnés précédemment en rapport avec la spécificité des gènes isolés dans

les plasmides pHT71 et pHT671.

Des essais de précipitation antigène-anticorps ont permis de déterminer le niveau d'expression des gènes de δ -endotoxine dans différents clones recombinants.

5 Les résultats obtenus ont montré que la protéine du cristal représente entre 7 et 10% de protéines cellulaires totales de E.coli JM83 (pHTA2), entre 2 et 3% dans E.coli JM83 (pHT671) et entre 0,5 et 1% dans E.coli JM83 (pHTA4) et E.coli, JM83 (pHT71).

10

15

20

25

30

35

Les références bibliographiques dont il est question dans les exemples sont les suivantes :

- 5 (1) KLIER, A.F., LECADET, M-M. and DEDONDER, R., 1973, Sequential modifications of RNA polymerase during sporogenesis in Bacillus thuringiensis, Eur. J. Biochem., 36 : 317-327.
- (2) MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York
- 10 (3) VIEIRA, J. and MESSING, J., 1982, The pUC plasmids, and M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, Gene, 19 : 259-268.
- 15 (4) LEDERBERG, E.M. and COHEN, S.N., 1974, Transformation of Salmonella thyphimurium by plasmid deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol., 119 : 1072-1074.
- (5) GRUNSTEIN, M. and HOGNESS, D.S., 1975, Colony hybridization, a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,
20 72 : 3961-3965.
- (6) SOUTHERN, E.M., 1975, Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Molec. Biol., 98, 503-517.
- 25 (7) DENHARDT, D.T. 1976, A membrane filter taking for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm., 23 : 641-646.
- (8) SANGER, F., NICKLENS, S. and COULSON, A.R., 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 5463-5467.
- 30 (9) DALE et al. (1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA, Plasmid 1985, 13 : 31-40
- (10) LECADET, M.M. et MARTOURET D. 1987, Host specificity of
35 the Bacillus thuringiensis δ -endotoxin toward

- Lepidopteran species : Spodoptera littoralis Bdv and Pieris brassicae L, J. of Invert. Pathol., 49 (n° 1) : 37-48.
- (11)CHANG - et al., 1979, High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA-
5 Mol Gen Genet 168:111 115
- (12)HEIERSON et al., 1987, Transformation of vegetative cells of Bacillus thuringiensis by plasmid DNA, Journal of Bacteriology, Mar.1987, p.1147-1152,
- 10 (13)KLIER et al., 1983, Mating between Bacillus subtilis and Bacillus thuringiensis and transfer of cloned crystal genes, Mol Gen Genet (1983) 191:257 262
- (14)LERECLUS et al., 1983, Isolation of a DNA, sequence related to several plasmids from Bacillus thuringiensis after a mating involving the Streptococcus faecalis
15 plasmid pAMP1, Mol Gen Genet (1983) 191:307-313
- (15)UMBECK et al., 1987, Genetically transformed cotton (Gossypium hirsutum L.) plants - Biotechnology vol.5 March 1987.
- 20 (16)WONG et al., 1983, transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. of Biol. Chem., 258 : 1960-1967.
- (17)OBUKOWICZ M. et al (1986). Tn⁵ mediated integration of the δ -endotoxin gene from B. thuringiensis into the
25 chromosome of root colonizing Pseudomonas. J. Bacteriol., 168, 982-989.
- (18)SIMON, R. et al, (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology, 1,
30 pp. 784-791.
- (19)Schnepf et al, (1985) The amino acid sequence of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from the DNA base sequence. J BIOL Chem 260 : 6264-6372.
- (20)Adang et al, (1985) Characterized full-length and
35 truncated plasmid clones of the crystal protein of

Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. Gene 36 : 289-300.

(21)Wabiko et al,(1986) Bacillus thuringiensis entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. DNA 5 : 305-314.

(22)Hofte et al,(1986) Structural and functional analysis of a cloned δ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis berliner 1715. Eur J Biochem 161 : 273-280.

(23)Shibano et al,(1986) Complete structure of an insecticidal crystal protein gene from Bacillus thuringiensis. In : Bacillus molecular genetics and biotechnology applications. J.Ganesan, A.T., Hoch, J.A.(eds). Academic Press 307-320.

(24)Oeda et al,(1987) Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of Bacillus thuringiensis strain aizawai IPL7 and its high-level expression in Escherichia coli. Gene 53 : 113-119.

REVENDICATIONS

- 1/ Séquence de nucléotides codant pour au moins
5 une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de S.littoralis.
- 2/ Séquence de nucléotides de 3 kb environ correspondant au fragment de restriction HindIII-PstI provenant de B.thuringiensis capable de s'hybrider avec les sondes 1, 2, 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2.
- 15 3/ Séquence selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comporte des sites dans l'ordre suivant :
Hind III - Hinc II - Bgl II - Kpn I - Hind III - Pst I -
- 4/ Séquence de nucléotides selon l'une quelconque
20 des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue in vitro à partir d'une souche unique de B.thuringiensis.
- 5/ Séquence de nucléotides selon la revendication 4, caractérisée en ce que la souche de B.thuringiensis
25 est la souche aizawai 7.29.
- 6/ Séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par recombinaison génétique in vitro de séquences d'ADN de deux souches différentes de B.thuringiensis.
- 30 7/ Séquence selon la revendication 6, caractérisée en ce que les 2 souches de B.thuringiensis correspondent respectivement aux souches entomocidus 6-01 et aizawai 7-29.
- 8/ Séquence de nucléotides, caractérisée en ce
35 qu'elle code pour un polypeptide capable de former un

45

complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S. littoralis.

9/ Séquence de nucléotides caractérisée en ce
5 qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée
à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement
suivant :

10

15

20

25

30

35

52
 GTC TAC TTG ACA GGG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT GGG GCA TAT ATT GAT
 112
 ATT TTA TAA AAT TTG TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
 172
 TCG TGG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA ATA AAA AAA CGG
 232
 AGC TAT TTT ATG CAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT
 292
 CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA GGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT
 352
 TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GGG GGA GCA TTT TTA GTT
 412
 GCA TTA ATA GAT TTT GTA TGG GCA ATA GTT GGC CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA GTA
 472
 CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT AGC AAT GCT GCT ATT GCT
 532
 AAT TTA GAA GGA TTA GCA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TGG GAA
 592
 GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CGC TTT CGT ATA CTT GAT
 652
 GCG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA
 712
 TCC GTT TAT GCT CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA ACA GAT TCT GTA ATT TTT
 772
 GGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT AGC
 832
 CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT GAC TGT GCA AAT ACC TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA
 892
 CCC AAA TCT ACG TAT CAA GAT TGG ATA ACA TAT AAT CGA TTA CGG AGA GAC TTA ACA TTG
 952
 ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC

cu à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement
 suivant :

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531
 532
 533
 534
 535
 536
 537
 538
 539
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547
 548
 549
 550
 551
 552
 553
 554
 555
 556
 557
 558
 559
 560
 561
 562
 563
 564
 565
 566
 567
 568
 569
 570
 571
 572
 573
 574
 575
 576
 577
 578
 579
 580
 581
 582
 583
 584
 585
 586
 587
 588
 589
 590
 591
 592
 593
 594
 595
 596
 597
 598
 599
 600
 601
 602
 603
 604
 605
 606
 607
 608
 609
 610
 611
 612
 613
 614
 615
 616
 617
 618
 619
 620
 621
 622
 623
 624
 625
 626
 627
 628
 629
 630
 631
 632
 633
 634
 635
 636
 637
 638
 639
 640
 641
 642
 643
 644
 645
 646
 647
 648
 649
 650
 651
 652
 653
 654
 655
 656
 657
 658
 659
 660
 661
 662
 663
 664
 665
 666
 667
 668
 669
 670
 671
 672
 673
 674
 675
 676
 677
 678
 679
 680
 681
 682
 683
 684
 685
 686
 687
 688
 689
 690
 691
 692
 693
 694
 695
 696
 697
 698
 699
 700
 701
 702
 703
 704
 705
 706
 707
 708
 709
 710
 711
 712
 713
 714
 715
 716
 717
 718
 719
 720
 721
 722
 723
 724
 725
 726
 727
 728
 729
 730
 731
 732
 733
 734
 735
 736
 737
 738
 739
 740
 741
 742
 743
 744
 745
 746
 747
 748
 749
 750
 751
 752
 753
 754
 755
 756
 757
 758
 759
 760
 761
 762
 763
 764
 765
 766
 767
 768
 769
 770
 771
 772
 773
 774
 775
 776
 777
 778
 779
 780
 781
 782
 783
 784
 785
 786
 787
 788
 789
 790
 791
 792
 793
 794
 795
 796
 797
 798
 799
 800
 801
 802
 803
 804
 805
 806
 807
 808
 809
 810
 811
 812
 813
 814
 815
 816
 817
 818
 819
 820
 821
 822
 823
 824
 825
 826
 827
 828
 829
 830
 831
 832
 833
 834
 835
 836
 837
 838
 839
 840
 841
 842
 843
 844
 845
 846
 847
 848
 849
 850
 851
 852
 853
 854
 855
 856
 857
 858
 859
 860
 861
 862
 863
 864
 865
 866
 867
 868
 869
 870
 871
 872
 873
 874
 875
 876
 877
 878
 879
 880
 881
 882
 883
 884
 885
 886
 887
 888
 889
 890
 891
 892
 893
 894
 895
 896
 897
 898
 899
 900
 901
 902
 903
 904
 905
 906
 907
 908
 909
 910
 911
 912
 913
 914
 915
 916
 917
 918
 919
 920
 921
 922
 923
 924
 925
 926
 927
 928
 929
 930
 931
 932
 933
 934
 935
 936
 937
 938
 939
 940
 941
 942
 943
 944
 945
 946
 947
 948
 949
 950
 951
 952
 953
 954
 955
 956
 957
 958
 959
 960
 961
 962
 963
 964
 965
 966
 967
 968
 969
 970
 971
 972
 973
 974
 975
 976
 977
 978
 979
 980
 981
 982
 983
 984
 985
 986
 987
 988
 989
 990
 991
 992
 993
 994
 995
 996
 997
 998
 999
 1000
 1001
 1002
 1003
 1004
 1005
 1006
 1007
 1008
 1009
 1010
 1011
 1012
 1013
 1014
 1015
 1016
 1017
 1018
 1019
 1020
 1021
 1022
 1023
 1024
 1025
 1026
 1027
 1028
 1029
 1030
 1031
 1032
 1033
 1034
 1035
 1036
 1037
 1038
 1039
 1040
 1041
 1042
 1043
 1044
 1045
 1046
 1047
 1048
 1049
 1050
 1051
 1052
 1053
 1054
 1055
 1056
 1057
 1058
 1059
 1060
 1061
 1062
 1063
 1064
 1065
 1066
 1067
 1068
 1069
 1070
 1071
 1072
 1073
 1074
 1075
 1076
 1077
 1078
 1079
 1080
 1081
 1082
 1083
 1084
 1085
 1086
 1087
 1088
 1089
 1090
 1091
 1092
 1093
 1094
 1095
 1096
 1097
 1098
 1099
 1100
 1101
 1102
 1103
 1104
 1105
 1106
 1107
 1108
 1109
 1110
 1111
 1112
 1113
 1114
 1115
 1116
 1117
 1118
 1119
 1120
 1121
 1122
 1123
 1124
 1125
 1126
 1127
 1128
 1129
 1130
 1131
 1132
 1133
 1134
 1135
 1136
 1137
 1138
 1139
 1140
 1141
 1142
 1143
 1144
 1145
 1146
 1147
 1148
 1149
 1150
 1151
 1152
 1153
 1154
 1155
 1156
 1157
 1158
 1159
 1160
 1161
 1162
 1163
 1164
 1165
 1166
 1167
 1168
 1169
 1170
 1171
 1172
 1173
 1174
 1175
 1176
 1177
 1178
 1179
 1180
 1181
 1182
 1183
 1184
 1185
 1186
 1187
 1188
 1189
 1190
 1191
 1192
 1193
 1194
 1195
 1196
 1197
 1198
 1199
 1200
 1201
 1202
 1203
 1204
 1205
 1206
 1207
 1208
 1209
 1210
 1211
 1212
 1213
 1214
 1215
 1216
 1217
 1218
 1219
 1220
 1221
 1222
 1223
 1224
 1225
 1226
 1227
 1228
 1229
 1230
 1231
 1232
 1233
 1234
 1235
 1236
 1237
 1238
 1239
 1240
 1241
 1242
 1243
 1244
 1245
 1246
 1247
 1248
 1249
 1250
 1251
 1252
 1253
 1254
 1255
 1256
 1257
 1258
 1259
 1260
 1261
 1262
 1263
 1264
 1265
 1266
 1267
 1268
 1269
 1270
 1271
 1272
 1273
 1274
 1275
 1276
 1277
 1278
 1279
 1280
 1281
 1282
 1283
 1284
 1285
 1286
 1287
 1288
 1289
 1290
 1291
 1292
 1293
 1294
 1295
 1296
 1297
 1298
 1299
 1300
 1301
 1302
 1303
 1304
 1305
 1306
 1307
 1308
 1309
 1310
 1311
 1312
 1313
 1314
 1315
 1316
 1317
 1318
 1319
 1320
 1321
 1322
 1323
 1324
 1325
 1326
 1327
 1328
 1329
 1330
 1331
 1332
 1333
 1334
 1335
 1336
 1337
 1338
 1339
 1340
 1341
 1342
 1343
 1344
 1345
 1346
 1347
 1348
 1349
 1350
 1351
 1352
 1353
 1354
 1355
 1356
 1357
 1358
 1359
 1360
 1361
 1362
 1363
 1364
 1365
 1366
 1367
 1368
 1369
 1370
 1371
 1372
 1373
 1374
 1375
 1376
 1377
 1378
 1379
 1380
 1381
 1382
 1383
 1384
 1385
 1386
 1387
 1388
 1389
 1390
 1391
 1392
 1393
 1394
 1395
 1396
 1397
 1398
 1399
 1400
 1401
 1402
 1403
 1404
 1405
 1406
 1407
 1408
 1409
 1410
 1411
 1412
 1413
 1414
 1415
 1416
 1417
 1418
 1419
 1420
 1421
 1422
 1423
 1424
 1425
 1426
 1427
 1428
 1429
 1430
 1431
 1432
 1433
 1434
 1435
 1436
 1437
 1438
 1439
 1440
 1441
 1442
 1443
 1444
 1445
 1446
 1447
 1448
 1449
 1450
 1451
 1452
 1453
 1454
 1455
 1456
 1457
 1458
 1459
 1460
 1461
 1462
 1463
 1464
 1465
 1466
 1467
 1468
 1469
 1470
 1471
 1472
 1473
 1474
 1475
 1476
 1477
 1478
 1479
 1480
 1481

991
 1081
 1171
 1261
 1351
 1441
 1531
 1621
 1711
 1801

161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

10/ Séquence de nucléotides codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement (I) ou (III) défini à la revendication 9.

11/ Séquence de nucléotides selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle présente un codon d'initiation ATG situé en position 241.

12/ Séquence selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée par un site de liaison aux ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

13/ Séquence selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence comprise entre les nucléotides en position 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon d'initiation ATG) qui est homologue à raison d'environ au moins 70% à la région présente en amont du gène du cristal de la souche Kurstaki-HD1 Dipel (BTK) qui contient les trois promoteurs BtI, BTII et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E.coli respectivement.

14/ Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (II) d'acides aminés ci-après :

25

30

35

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN
PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE
SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL
GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL
GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA
ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU
GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP
GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU
SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE
GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG
HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU
PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU
THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

ou qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV)
d'acides aminés ci-après :

271 MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN LYS ILE
 281 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE SER LEU SER
 301 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL IAP GLY ILE VAL GLY PRO SER
 321 GLN IAP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU
 341 LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU IAP GLU GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE
 361 ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR
 381 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG IAP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU
 401 TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER
 421 THR TYR GLN ASP IAP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

331

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER
 1081 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE
 1171 THR ASP TAP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TAP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO
 1261 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG
 1331 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR
 1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS
 1531 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL PHE SER TAP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN
 1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TAP GLY GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE
 1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG
 1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

54

1951 ASN MET PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR THR ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE
 1961 PHE ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE
 2071 GLU ILE ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN
 2161 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP
 2251 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 2611 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP
 2701 CYS SER CYS

15/ Vecteur recombinant d'expression et de clonage comportant au moins une partie de la séquence nucléotidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14.

5 16/ Plasmide selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il s'agit de pHT671 tel que représenté sur la figure 4, ou de pHT71 comprenant un fragment d'ADN HindIII-PstI constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7.29.

10 17/ Souches bactériennes modifiées, caractérisées en ce qu'après transformation elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 14.

15 18/ Souche bactérienne selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un vecteur recombinant selon la revendication 15 ou 16,

20 19/ Polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

25 20/ Polypeptide selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence (II) ou la séquence (IV) d'acides aminés définies dans la revendication 14.

30 21/ Procédé d'obtention d'une séquence nucléotidique codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé par les étapes suivantes :

- la réalisation d'une hybridation entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis

active contre S.littoralis et d'autre part, une ou plusieurs séquences de nucléotides utilisées comme sondes provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène d'une δ -endotoxine de B.thuringiensis cette partie codant pour la partie N-terminale d'un polypeptide toxique vis-à-vis des lépidoptères et provenant de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du polypeptide,

- l'isolement du fragment,

- son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

22/ Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène d'une δ -endotoxine provenant d'une souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de 130kDa active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

23/ Procédé selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'au moins une séquence de nucléotides issue d'au moins un vecteur recombinant contenant une séquence de nucléotides d'au moins une souche de B.thuringiensis.

24/ Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins 2 souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis.

25/ Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape

de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant de la souche aizawai 7-29.

26/ Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment de restriction HincII-PstI provenant de la souche aizawai 7-29.

27/ Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le fragment de restriction recombiné selon la revendication 25 est porté préférentiellement par un plasmide pHTA6 et les fragments de restriction recombinés selon la revendication 26, HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés préférentiellement par les plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6, lesdits plasmides pHTA6 et pHTE6 étant tels qu'isolés à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotidiques issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

28/ Composition larvicide à activité préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace de polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 19 à 20 exprimé par les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 14, le vecteur selon la revendication 15, ou le plasmide selon la revendication 16, ou la souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18.

29/ Application des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour produire

un polypeptide toxique vis-à-vis de lépidoptères, de préférence S.littoralis, dans des microorganismes capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences tels que E.coli, B.subtilis, B.cereus ou B.thuringiensis.

30/ Application selon la revendication 29, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes, tels que Pseudomonas, Azospirillum ou Rhizobium et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences.

31/ Application selon la revendication 29 ou 30, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes en association avec différents gènes de δ -endotoxine.

32/ Application des séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 à la transformation des plantes sensibles à S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend le transfert et l'expression de ces séquences dans ces plantes.

33/ Cellules végétales dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14 et, cellules issues de leur division.

34/ Plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, transformées par un procédé non essentiellement biologique, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis et,

plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication, ou de croisements hybrides.

35/ Plante ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans son génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

36/ Graine capable de donner une plante selon la revendication 34 ou 35 ou issue d'une telle plante, caractérisée en ce qu'elle a intégré dans son génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

20

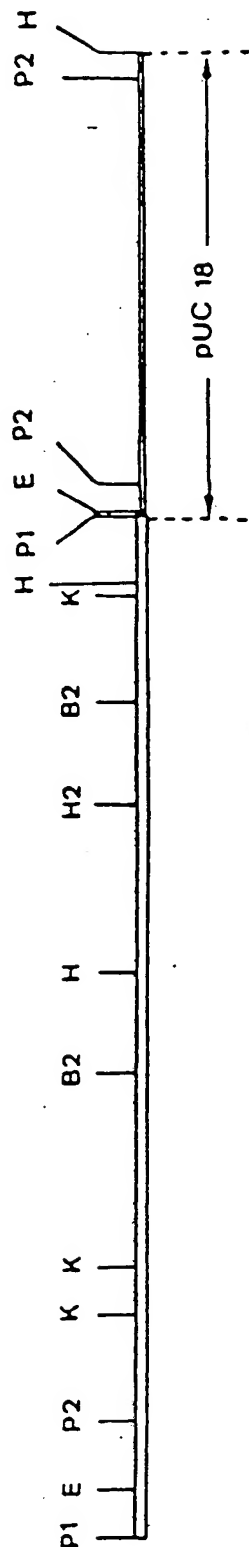
25

30

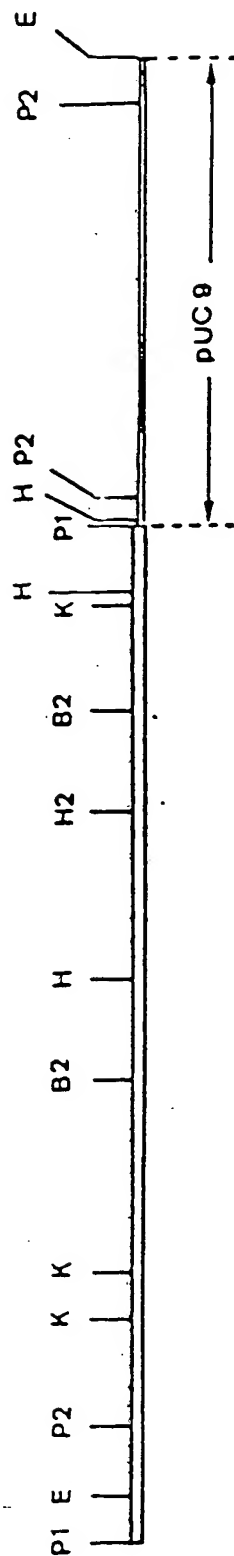
35

FIGURE 1

pHTA 6



pHTE 6



B2 : Bgl II

E : Eco RI

H2 : Hinc II

H : Hind III

K : Kpn I

P1 : Pst I

P2 : Pvu II

1Kb

FIGURE 2

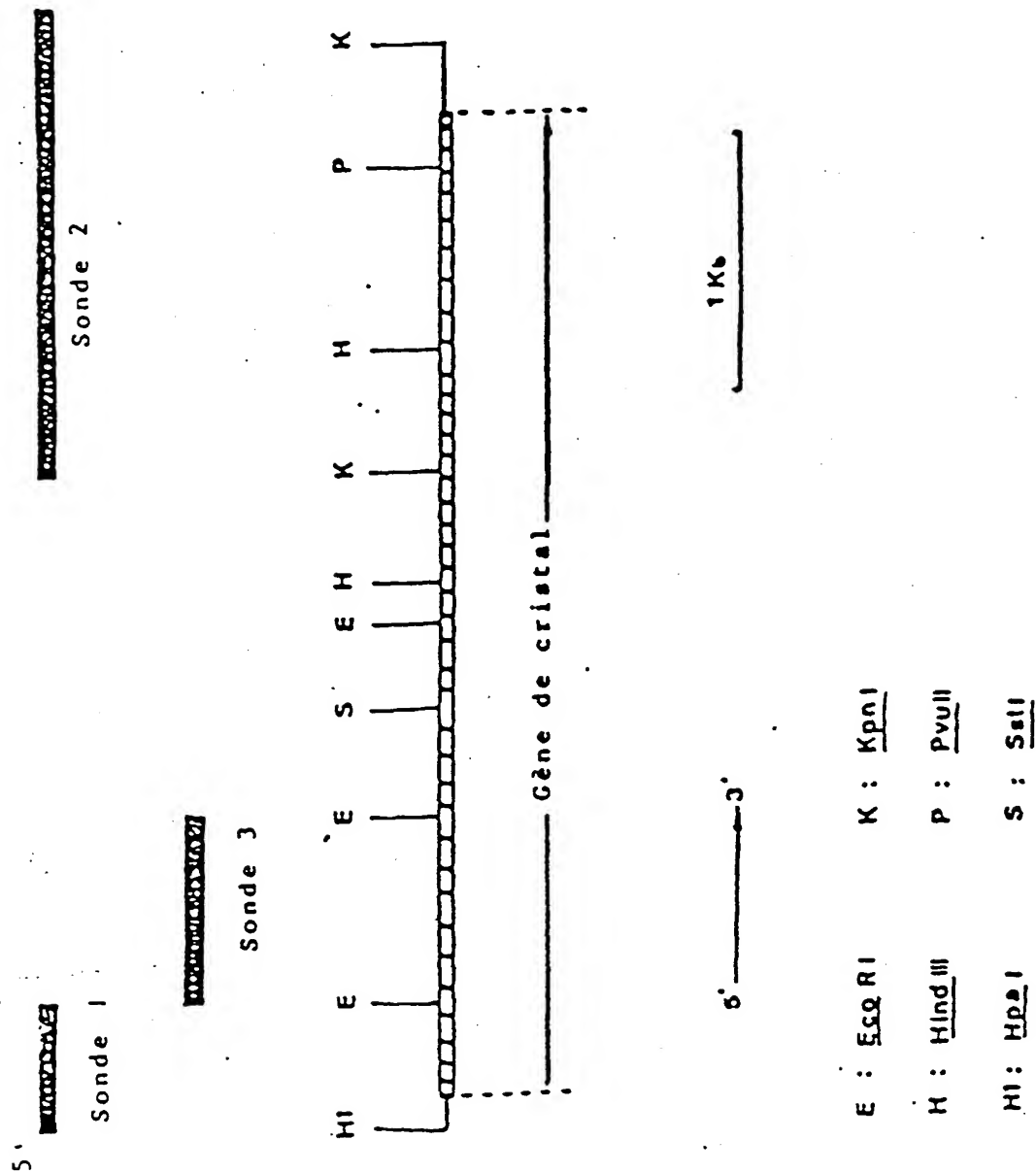
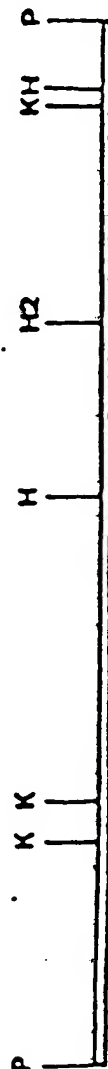


FIGURE 3



Sonde 1



Sonde 2



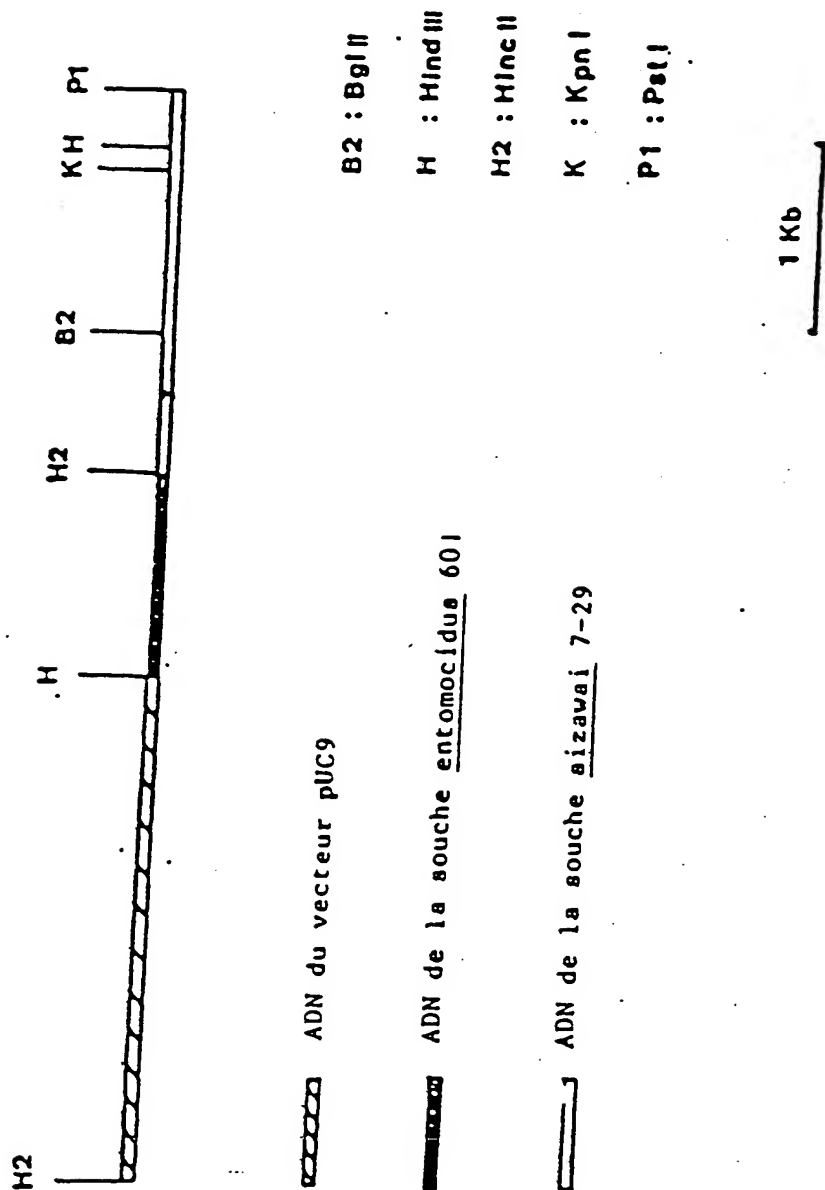
Sonde 3

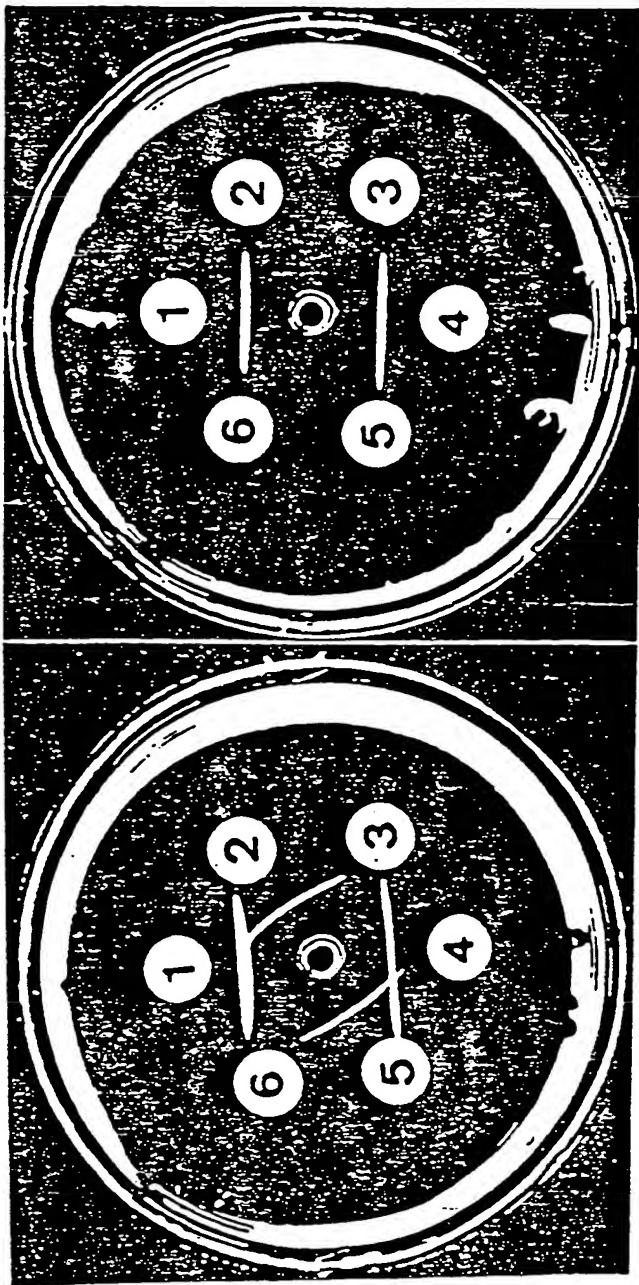


4/5

FIGURE 4

PHT 671





A

B

Figure 5